

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Jenny)

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. C. C. Kuenzle

Veränderung der Repetitionslänge von neuronaalem Chromatin im Verlauf der Gehirnentwicklung der Ratte

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
ADRIAN WALTER JAEGER
Tierarzt

von Pfäfers und Winterthur

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. C. C. Kuenzle, Referent
Prof. Dr. E. Jenny, Korreferent

1982
aku-Fotodruck Zürich



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507225_0041

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Jenny)
Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. C. C. Kuenzle

Veränderung der Repetitionslänge von neuronalem Chromatin im Verlauf der Gehirnentwicklung der Ratte

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
ADRIAN WALTER JAEGER
Tierarzt
von Pfäfers und Winterthur

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. C. C. Kuenzle, Referent
Prof. Dr. E. Jenny, Korreferent

1982

aku-Fotodruck Zürich



INHALTSVERZEICHNIS

1. Abkürzungen und Erklärungen
2. Aufgabenstellung
3. Einleitung
 - 3.1. Entwicklung des Grosshirns
 - 3.2. Entwicklung des Kleinhirns
 - 3.3. Das Chromatin
4. Material und Methoden
 - 4.1. Material
 - 4.1.1. Versuchstiere
 - 4.1.2. Apparate
 - 4.1.3. Chemikalien, DNS und Enzyme
 - 4.2. Methoden
 - 4.2.1. Radioaktive Markierung der Versuchstiere
 - 4.2.1.1. Postnatale Markierung
 - 4.2.1.2. Pränatale Markierung
 - 4.2.2. Präparation des Kortex
 - 4.2.3. Isolation der Kortexneuronkerne
 - 4.2.4. Isolation der Leberkerne
 - 4.2.5. Isolation von Kleinhirn-Körnerzellen
 - 4.2.6. Isolation von Gliazellkernen
 - 4.2.7. Verdauung der Kerne mit Mikrokokken-Nuklease
 - 4.2.8. DNS-Extraktion
 - 4.2.9. Gelelektrophorese
 - 4.2.10. Ausmessen der Repetitions-längen
 - 4.2.11. Statistische Auswertung
5. Resultate und Diskussion
 - 5.1. Vorversuch zur Optimierung des Verdauungsvorgangs mit Mikrokokken-Nuklease
 - 5.2. Repetitions-längen im Chromatin von Kortexneuronen
 - 5.2.1. Totalchromatin
 - 5.2.2. Postnatal synthetisiertes Chromatin
 - 5.2.3. Pränatal synthetisiertes Chromatin
 - 5.2.4. Interpretation der Befunde

- 5.3. Repetitionslängen im Chromatin von Kleinhirn-Körnerzellen
- 5.4. Repetitionslängen im Chromatin von Leberzellen
- 5.5. Repetitionslängen im Chromatin von nicht-astrozytären Gliazellen im Kortex

- 6. Zusammenfassung
- 7. Tabellen
- 8. Literaturverzeichnis
- 9. Dankesadressen
- 10. Lebenslauf

1. ABKUERZUNGEN UND ERKLAERUNGEN

MG	Molekulargewicht
DNS	Desoxyribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
ss-DNS	einzelsträngige DNS
ds-DNS	doppelsträngige DNS
DNase	Desoxyribonuklease
RNase	Ribonuklease
Restriktions- endonuklease	(Endodesoxyribonuklease) spezielle Nuklease bakterieller Herkunft, die spezifische Basensequenzen auf ds-DNS erkennt und endonukleolytisch spaltet.
Hae III	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus</i> <i>aegyptius</i> , die folgende DNS Sequenz endonukleolytisch spaltet $\begin{array}{c} 5' \text{--G G} \mid \text{C C --} 3' \\ 3' \text{--C C} \mid \text{G G --} 5' \end{array}$
ØX 174 DNS-Marker	Der Bakteriophage ØX 174 vermehrt sich im Bakterium <i>Escherichia coli</i> . Seine doppelsträngige DNS wird isoliert und mit Hae III verdaut. Die Grössen der einzelnen Fragmente sind durch Sequen- zierung genau bekannt. (Sanger et al 1978)
2c	DNS - Gehalt einer diploiden Zelle
4c	DNS - Gehalt einer tetraploiden Zelle
Histone	basische Proteine, die im Zellkern an die DNS gebunden sind und mit dieser das Chromatin bilden. Man unterscheidet fünf Histone nach ihren Ketten: H1, H2A, H2B, H3 und H4
Mio	Million
V	Volt
mV	Millivolt
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
g	Gramm

mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Ci	Curie
mCi	Millicurie
µCi	Mikrocurie
d	Tag
h	Stunde
min	Minute
s	Sekunde
cm	Centimeter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
U	Unit. Einheit der Enzymaktivität (1 µMol Substratumsatz pro min)
M	Molarität
A	Ampère
mA	Milliampère
g	Zentrifugalbeschleunigungen werden als vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$) angegeben und sind jeweils für die Mitte der Zentrifugenröhrchen berechnet
%	prozentuale Konzentrationsangabe in Gramm pro 100 ml
[³ H] Thymidin	[Methyl- ³ H] Thymidin
BP	Basenpaare der DNS
PVP	Polyvinylpyrrolidon K 30, durchschnittliches MG = 40'000
BSA	Bovines Serumalbumin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
EDTA	Aethylendiamintetraazetat
TCA	Trichloressigsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
SDS	Natriumdodecylsulfat
PPO	2,5-Diphenyloxazol, Szintillator für die Fluorographie von Gelen
Nonidet	nicht ionisches Detergens, verhindert das Verklumpen von isolierten Zellkernen in Suspension.

2. AUFGABENSTELLUNG

Gewisse Zellen eines Säugetierorganismus verlieren nach der Geburt die Fähigkeit, sich weiter zu teilen. Dies ist bei Nerven- und Muskelzellen der Fall, während zum Beispiel die Dünndarmepithelzellen ihre Mitosefähigkeit lebenslang beibehalten. Der Zeitpunkt, ab welchem die Nervenzellen, im speziellen die kortikalen Neurone, sich in der Foetalentwicklung nicht mehr weiter teilen, ist tierartlich verschieden. Der Entwicklungsgrad der Foeten bei der Geburt scheint hier eine Rolle zu spielen. So fällt dieser Zeitpunkt bei der Ratte, einem Nesthocker, mit der Geburt zusammen, während bei Nestflüchtern, zum Beispiel dem Meeresschweinchen, dieser Punkt in die Mitte der Foetalentwicklung fällt (Martin 1962).

In Rattenneuronen kann während der ersten 3 Wochen post partum eine vom Zellzyklus unabhängige DNS-Synthese beobachtet werden. Dabei nimmt der DNS-Gehalt eines jeden Kortexneurons von anfänglich 2c bei der Geburt auf etwa 3c zu (Bregnard et al 1975, Bregnard und Kuenzle 1976, Bregnard et al 1979).

Eine weitere Besonderheit der Kortexneurone betrifft ihr Chromatin. So findet sich in Kortexneuronen der adulten Ratte eine mittlere Chromatin-Repetitionslänge von 160 BP, gegenüber 200 BP in der DNS von nicht-astrozytären Gliazellen (Thomas und Thompson 1977). Der Vergleich von Repetitionslängen aus foetalen Rattenneuronen (20. Trächtigkeitstag = 2 Tage ante partum) mit solchen von Ratten im Alter von 7, 30 sowie 60 Tagen post partum wurde von Ermini und Kuenzle beschrieben (Ermini und Kuenzle 1978). Es zeigte sich, dass in neuronalem Chromatin von Foeten die Repetitionslänge noch jener der meisten anderen Gewebe entsprach (195 BP), während die späteren Stadien eine

durchschnittliche Repetitionslänge von 174 BP aufwiesen. Diese Beobachtung wurde von anderen Autoren bestätigt (Brown 1977, Whatley et al 1981). Daraus wurde gefolgert, dass in der frühen postnatalen Entwicklung eine Verkürzung der Chromatin-repetitionslänge stattfindet, die zeitlich mit der Zunahme der postnatal gebildeten, neuronalen DNS zusammenfällt (Ermini und Kuenzle 1978).

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Repetitionslänge im Chromatin von Kortexneuronen der Ratte in enggestuften Zeitabständen vom Ende der Foetalentwicklung (-4 Tage), bis ins adulte Stadium (60 Tage) zu untersuchen. Zum Vergleich sollten von den entsprechenden Tieren die Leberzellen und die Körnerzellen des Kleinhirnes mitpräpariert und die Repetitionslängen ihres Chromatins analog ausgemessen werden. Als weitere Kontrolle sollten Gliazellen aus dem Kortex von 30 Tage alten Tieren untersucht werden. Ziel dieses Versuchsplanes war es, Grundlagen für einen Vergleich zwischen den Veränderungen der Repetitionslänge und der DNS-Zunahme in Neuronen im Verlauf der Frühentwicklung zu erarbeiten. Aus diesem Vergleich sollte hervorgehen, ob eine enge zeitliche Uebereinstimmung dieser beiden Phänomene besteht.

3. EINLEITUNG

3.1. ENTWICKLUNG DES GROSSHIRNS

Während der frühen Embryonalentwicklung besteht das Neuralrohr vorerst aus einem einheitlichen Verband von neuroektodermalen Germinalzellen, die sich noch laufend teilen. Mit der Ausbildung des Gehirnes und seiner verschiedenen Abschnitte verlieren einige dieser Germinalzellen ihre Mitosefähigkeit, wandern von der periventrikulären Keimschicht aus und bilden aussen eine Mantelzone aus jungen Neuronen. (Abb. 1)

Durch die zeitlich gestaffelte Auswanderung aus der Germinalzone entsteht in der Mantelzone eine charakteristische Schichtung von jungen Neuronen, wobei die ältesten Neuronen zuinnerst, die zuletzt differenzierten zuäusserst zu liegen kommen. Die Auswanderung ist zeitlich genau festgelegt (Abb. 2). Sie beginnt bei der Ratte am 16. Trächtigkeitstag und endet kurz vor der Geburt am 21. Trächtigkeitstag (Berry et al 1964). In diesen Zeitabschnitt fällt auch die vorläufige Differenzierung eines anderen Teils periventrikulärer Germinalzellen zu Glioblasten. Erst in der Endphase der Foetalentwicklung bildet sich die Germinalzone zurück, die dann als Subependymalschicht bezeichnet wird. Nach der Geburt findet man diese nur noch als dünne Zellage in der lateralen Wand der Seitenventrikel. Von ihr wandern zwar noch einige Zellen aus zum Riechhirn, in den Hippocampus und zu den Basalkernen, nicht aber in den Kortex.

Die Bildung von Makroglia aus den Glioblasten beginnt um den 7. Lebenstag und dauert bis ins adulte Stadium. Parallel dazu setzt auch die Myelinisierung ein. Sie ist mit der Gliogenese eng gekoppelt und dauert bis zur 16. Lebenswoche. (Jacobson 1978, Rakic 1981, Abb. 3).

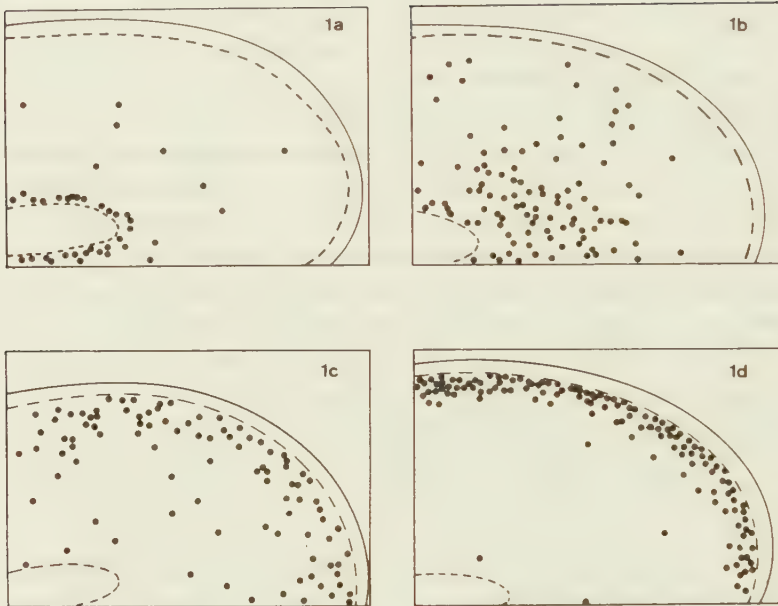


Abb 1

Migration von jungen, radioaktiv markierten Neuronen aus der periventriculären Germinalzone an die Peripherie des Kortex, dargestellt anhand von Autoradiographien histologischer Schnitte durch die Grosshirnhemisphären und Seitenventrikel der Ratte (schematisch).

Abb 1a zeigt die Situation vor dem 15. Trächtigkeitstag.

Abb 1b und 1c zeigen die Situation zwischen dem 16. und dem 21. Trächtigkeitstag.

Abb 1d zeigt die Situation wenige Stunden nach der Geburt.

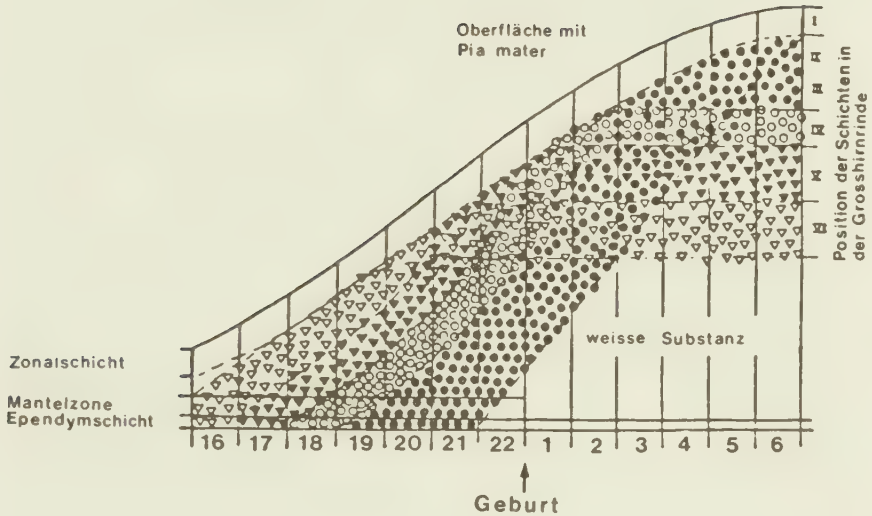
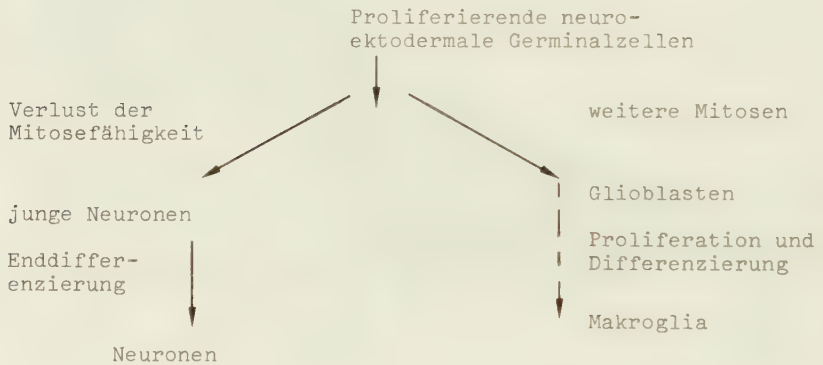


Abb 2

Entwicklung der Kortexschichten. Ab dem 16. Trächtigkeitstag wandern verschiedene Populationen von Kortexneuronen zeitlich gestaffelt in die Peripherie aus und ordnen sich zu den Kortexschichten I bis VI. Je später in der Foetalentwicklung die Zellen auswandern und differenzieren, desto weiter aussen kommt die gebildete Schicht zu liegen. Die Zellpopulationen, die zwischen dem 19. und dem 21. Trächtigkeitstag gebildet werden, lassen sich nicht mehr einer einzelnen Schicht zuordnen, sondern bilden gemeinsam die Schichten II und III.

Abb 3 : Zelluläre Differenzierung von neuroektodermalen
Germinalzellen zu Neuronen bzw. Gliazellen.
(Rakic 1981)



Im Gefolge der fortschreitenden Myelinisierung wickelt sich auch die funktionelle Reifung des Gehirnes ab, was sich zum Beispiel durch das Öffnen der Augen am 17. Lebenstag zu erkennen gibt.

3.2. ENTWICKLUNG DES KLEINHIRNS

Es sei hier nur auf die Besonderheiten der Entwicklung von Kleinhirn-Körnerzellen hingewiesen. Die Entwicklung des Kleinhirnes verläuft in vielen Stufen sehr ähnlich wie jene des Grosshirnes. Die zelluläre Enddifferenzierung erfolgt später als bei Kortexneuronen. Körnerzellen sind kleine Neurone der Kleinhirnrinde. Sie wandern ab dem 13. Embryonaltag aus der periventrikulären Germinalzone des Neuralrohres an die Peripherie und bilden dort die äussere Körnerschicht. Dabei behalten sie ihre Mitosefähigkeit. Die ausgewanderten jungen Körnerzellen teilen sich zwischen dem 7. und dem 14. Postnataltag laufend. Erst im Verlauf ihrer Enddifferenzierung verlieren sie ihre Teilungsfähigkeit und wandern durch die äussere Körnerschicht, die Molekularschicht und die Purkinjezellschicht nach innen, wo sie anschliessend die innere Körnerschicht bilden. Die Wanderung und Enddifferenzierung der Körnerzellen ist am 21. Lebenstag abgeschlossen. Die äussere Körnerschicht lässt sich zu diesem Zeitpunkt auf einem Kleinhirnschnitt kaum mehr erkennen (Abb. 4) (Jacobson 1978).

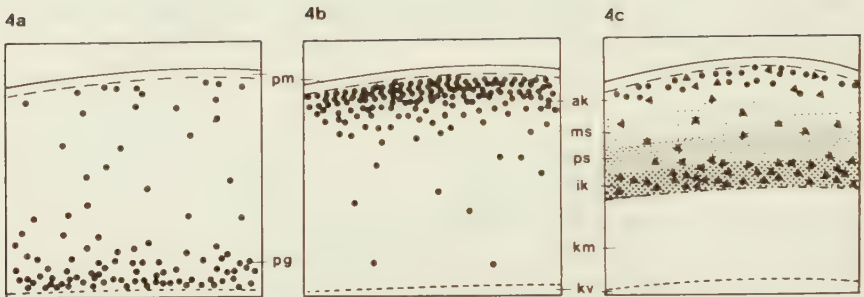


Abb 4

Autoradiographien von Kleinhirnschnitten, nach Injektion von $[^3\text{H}]$ Thymidin. Sie zeigen schematisch die zuerst nach aussen, dann nach innen gerichtete Wanderung von Kleinhirn-Körnerzellen (modifiziert nach Fujita 1967).

Abb 4a zeigt die um den 13. Embryonaltag einsetzende Wanderung mitotischer Vorstufen von Körnerzellen an die Kleinhirnperipherie (●).

Abb 4b zeigt die zwischen dem 7. und 14. Lebenstag entstandene äussere Körnerschicht des Kleinhirns, die starke Mitoseaktivität aufweist (●).

Abb 4c zeigt die nach dem 14. Lebenstag einsetzende Wanderung der Zellen in zentraler Richtung und ihre Formierung unterhalb der Purkinjeschicht zur inneren Körnerschicht. Diese Zellen sind mit dem (▲)-Symbol dargestellt.

ak = äussere Körnerschicht, ms = Molekularschicht, ps = Purkinjeschicht, ik = innere Körnerschicht, km = Kleinhirnmark, kv = Kleinhirnvtrikel, pg = periventrikuläre Germinalschicht, pm = pia mater.

3.3. DAS CHROMATIN

Die Substanz, aus welcher die Chromosomen höher entwickelter Zellen bestehen, ist das Chromatin. Es setzt sich aus zwei Arten chemischer Verbindungen zusammen, nämlich aus Proteinen und DNS. Die Proteine überwiegen mengenmässig gegenüber der DNS, dem alleinigen Träger der genetischen Information. Bei den Proteinen werden Histone und sogenannte Nichthistone unterschieden. Es gibt 5 Arten von Histonen, die als H1, H2A, H2B, H3 und H4 bezeichnet werden. Diese fünf Histone bilden mit der assoziierten DNS die strukturelle Einheit des Chromatins, das Nukleosom. Der Kern des Nukleosoms besteht aus je 2 Exemplaren der Histone H2A, H2B, H3 und H4, die zusammen ein Oktamer bilden. Um dieses windet sich die DNS in charakteristischer Weise und verbindet ausserdem die einzelnen Histonoktamere über das sogenannte Verbindungsstück miteinander. Das Histon H1 ist diesem Verbindungsstück angelagert. So reihen sich Nukleosomen in regelmässigen Abständen hintereinander, wodurch das Chromatin ein perlschnurartiges Aussehen erhält (Abb 5, 6).

Die Rolle der Nichthistone ist noch nicht ganz geklärt. Allerdings weiss man heute, dass diese Proteine sowohl aussen auf den Histonkugeln an der DNS sowie auf der DNS des Verbindungsstückes liegen und gewisse regulatorische Funktionen im Zusammenhang mit der Genexpression und der DNS-Replikation erfüllen. Die Länge der mit einem Nukleosom assoziierten DNS, die sogenannte Repetitionslänge, kann, je nach Organismus und Gewebe, zwischen 146 und 240 BP variieren (Felsenfeld 1978). Das Bestehen solcher Unterschiede ergab sich aus Untersuchungen, bei welchen mit Hilfe einer Mikrokokken-Nuklease das Chromatin der Zellkerne kurzzeitig verdaut, und die entproteinisierten DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt wurden. Der erste Angriffspunkt dieses Enzyms liegt auf dem DNS-Verbindungsstück, welches die Nukleosomen miteinander verbindet.

Abb 5

Modell des Chromatins. Die aneinandergereihten Nukleosomen geben dem Chromatin in aufgefaltetem Zustand ein perlschnurartiges Aussehen (modifiziert nach Kornberg 1981).

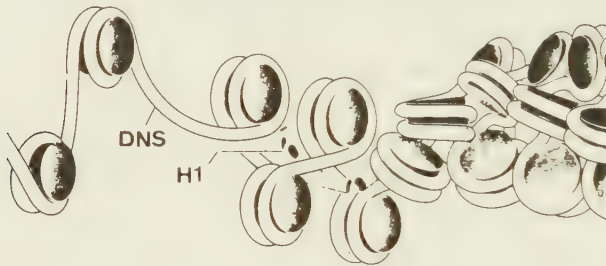
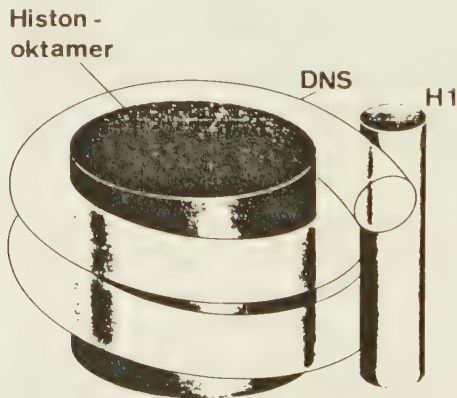


Abb 6

Modell eines Nukleosoms mit dem zentralen Histonoktamer und dem vorge-lagerten Histon H1. Um den Histonkern windet sich die DNS 2 mal in einer Linksschraube. Die Verbindungsstücke der DNS sind hier sehr kurz gezeichnet (modifiziert nach Kornberg und Klug 1981).



Da bei kurzzeitiger Verdauung nicht alle Verbindungsstücke gespalten werden, bleiben auch zwei, drei oder mehrere Nukleosomen miteinander verknüpft. Daraus resultiert eine statistische Verteilung diskreter DNS-Längen, die ganzzahligen Vielfachen der Monomerlänge entsprechen. Letztere wird auch als Repetitionslänge bezeichnet. Man bestimmt sie aus den Grössenunterschieden zwischen zwei aufeinanderfolgenden oligomeren DNS-Bruchstücken.

Lässt man die Nuklease lang genug einwirken, so werden alle Nukleosomen soweit abgebaut, dass nur noch die dem Histonoktamer aufgelagerten DNS-Windungen zurückbleiben. Diese Partikel nennt man Nukleosomenkernstücke (Core). Die zugehörigen DNS-Abschnitte sind im Chromatin aller bisher untersuchten Gewebe gleich gross und betragen 146 BP. Die Unterschiede in den Repetitionslängen verschiedener Gewebe stammen demnach allein von den Längenunterschieden der Verbindungsstücke.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. MATERIAL

4.1.1. VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden ausschliesslich weisse Ratten vom Stamm Zur: SIVZ verwendet. Sie wurden vom Institut für Zucht-hygiene der hiesigen Fakultät geliefert.

Um das Alter der Foeten möglichst genau bezeichnen bzw. den Geburtstermin auf 1/2 Tag genau vorausberechnen zu können, wurden die deckungsfähigen Weibchen über Nacht während nur 16 Stunden mit dem Bock zusammengebracht. Um dennoch eine genügende Anzahl trächtiger Tiere zu bekommen, wurde jeweils die doppelte Menge der effektiv benötigten Muttertiere zum Deckakt angesetzt. Von 10 angesetzten Weibchen wurden so jeweils 6-7 trächtig. Die hochträchtigen Muttertiere wurden in den instituts-eigenen Versuchstierstall verbracht und bis zur Geburt nicht mehr verstellt. Die durchschnittliche Wurfgrösse betrug 12 bis 15 Tiere.

Um die Veränderung der Repetitions-längen während der spät-embryonalen und postnatalen Entwicklung der Zellen zu verfolgen, wurden Tiere in den Altersstufen: -4d, -2d, -1d, 2h, 6h, 24h, 72h, 5d, 7d, 14d, 15d, 17d, 21d, 30d, 42d, 60d, zur Präparation verwendet. Der Geburtstermin wurde in der Skala als Nullpunkt eingesetzt. Die Trächtigkeitsdauer des verwendeten Rattenstamms beträgt 22d. Für die Altersbezeichnung der Foeten wurden vom errechneten Geburtstermin her rückwärts zählend jeweils negative Indices verwendet (z.B. -2d für den 20. Trächtigkeitstag). Die Repetitions-längen des Chromatins wurden bis zum 60. Lebens-tag verfolgt. In diesem Alter gelten die Tiere als adult.

4.1.2. APPARATE

- Beckman L5-65 Ultrazentrifuge mit den Ausschwingrotoren Spinco SW 27 und SW 50 (Beckman Instruments Inc, Spinco Division, Palo Alto, Cal., USA)
- Sorvall Superspeed RC2-B Kühlzentrifuge mit HB-4 Ausschwingrotor (Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Conn., USA)
- Beckman Spectrophotometer Acta 3 (Beckman Instruments, Scientific and Process Instruments Division, Fullerton, Cal., USA)
- Handhomogenisator 15ml nach Dounce mit Kolben 'S', eng eingepasst, Differenzmass 0.02 mm, und Kolben 'L', Differenzmass 0.06 mm (B. Braun, Apparatebau, Melsungen, BRD)
- Alzet Osmotic Mini-Pump Modell 2001 (Alza Corp., Palo Alto, USA)
- Spencer Bright-Line Zählkammer (American Optical Company, Scientific Instruments Division, Buffalo, N.Y., USA)
- Nylonnetze mit den Maschenweiten 670 μm , 335 μm , 112 μm , 75 μm (Schweizerische Seidengazefabrik AG, Zürich)
- Umkehrmikroskop Wild M 40 mit Phasenkontrastoptik (Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg SG)
- Gelapparatur System Bio-Rad, modifiziert (Eigenbau)
- Powersupply LKB Biochrom 2103 (Werner Meyer AG, Luzern)
- Betrachterschrank mit UV Lichtquelle 254 nm (Fluosol Universal, Quarzlampen GmbH, Hanau, BRD)
- Photographische Repro-Kamera Polaroid-Land MP3 mit Stativ und Filmmagazin Polaroid-Land Typ 545 (Polaroid AG Zürich)
- Mittelformatkamera mit Wechselmagazin Hasselblad 500 C/M (Kodak SA, Lausanne)

- Joyce Loeb1 double beam recording Microdensitometer
MK III Serie Nr 775 (Joyce Loeb1 & Co Ltd., Electron
House, Princessway, Team Valley, Gateshead on Tyne, U.K.)

4.1.3. CHEMIKALIEN

- Saccharose reinst (Merck Nr 7653)
- Tris (Merck Nr 8382)
- EDTA (Merck Nr 8418)
- BSA (Fluka Buchs SG)
- Ethidiumbromid (SIGMA Nr E 8751)
- Mikrokokkennuklease Lot 4798 (Worthington Biochem Corp,
New Jersey, USA)
- [Methyl-³H]-Thymidin, TRK 637, 40-60 Ci/mMol (The Radio-
chemical Centre, Amersham, Bucks, U.K.)
- ØX 174 DNS, Hae III verdaut (PL-Biochemicals GmbH,
St. Goar, BRD)
- ØX 174 DNS, Hae III verdaut, markiert mit [Methyl-³H]-
Thymidin 420, µCi/mg DNS, 0.0024 µg/0,2ml, Lot Nr 1328-099,
NEN-NET 644 (New England Nuclear, Boston, Mass., USA)
- Acrylamid/Bisacrylamid, 98% rein, dreifach umkristallisiert
(SERVA)
- Ammoniumperoxodisulfat (Merck Nr 1201)
- TEMED (Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA)
- PPO Scintillator (Merck Nr 2946)
- Spermin / Spermidin (SIGMA)
- Bromphenolblau (SIGMA)
- alle übrigen Chemikalien waren handelsübliche Produkte von
analytischem Reinheitsgrad. Bezugsquelle: Bender und Hobein
AG in Zürich.

4.2. METHODEN

4.2.1. RADIOAKTIVE MARKIERUNG DER VERSUCHSTIERE

Für den fluorographischen Nachweis radioaktiver DNS auf Elektrophoresegelen waren Markierungsmethoden zu wählen, welche möglichst hohe spezifische Aktivitäten versprachen. In allen Versuchen wurde die radioaktive Markierung in vivo durch Injektion einer wässrigen Lösung von [^3H] Thymidin vorgenommen. Sowohl die Dosierung wie auch die Applikationsform wurden variiert. Die einzelnen Versuchsserien mit jeweils gleichen Markierungsschemata wurden mit einem internen Code bezeichnet.

4.2.1.1. Postnatale Markierung

Es wurden folgende Codes verwendet:

Thy neug:

Die Jungen eines Wurfes erhielten 2 Stunden nach der Geburt 1 Injektion mit 1,5 mCi [^3H] Thymidin in 9 μl H_2O mittels Hamilton-Spritze 3 mm tief in den rechten Seitenventrikel. Zwei Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet und präpariert.

Thy 0:

Von 4 gleichzeitig werfenden Rattenmüttern wurden die insgesamt 40 Jungen 4 bis 5 Stunden nach der Geburt durch einmalige Injektion von je 1,0 mCi (6 μl) [^3H] Thymidin in den rechten Seitenventrikel markiert. Die ersten 6 Jungtiere wurden 6 Stunden nach der Injektion präpariert. Weitere 6 Junge wurden nach 24 Stunden präpariert und nochmals 18 Stück nach 7 Tagen. Danach entwickelten sich die restlichen Tiere stark verzögert und starben. Sie konnten für die Präparation nicht mehr verwendet werden.

Thy post:

Die Würfe von zwei Rattenmüttern erhielten 2 bis 3 Stunden nach Beendigung der Geburt 1,0 mCi (6 μ l) [3 H] Thymidin pro Junges durch einmalige Injektion in den rechten Seitenventrikel. Die Jungen wurden 6 Stunden bzw. 5 Tage nach der Injektion präpariert.

Wurf H:

Alle Jungen eines Wurfes erhielten während den ersten 7 Lebenstagen jeweils morgens und abends je eine Injektion mit 15 μ Ci (15 μ l) [3 H] Thymidin in wässriger Lösung subcutan am Hals. Die total 14 Injektionen ergaben eine Gesamtdosis von 210 μ Ci pro Tier. Die Präparation der Tiere erfolgte im Alter von 21 Tagen.

4.2.1.2. Pränatale Markierung

Dafür musste eine Applikationsform gefunden werden, welche die Foeten im Uterus möglichst gut markiert, andererseits aber bei den Jungen keinen lethalen Strahlenschaden verursacht. Auch hier wurden die verschiedenen Versuchsserien mit einem internen Code versehen:

Thy -1/-2 :

Zwei trächtigen Ratten wurde am 19. und 20. Trächtigkeitstag morgens und abends je eine intraperitoneale Injektion mit 2,5 mCi (2,5 ml) [3 H] Thymidin verabreicht, was einer Gesamtdosis von 10 mCi pro Rattenmutter entsprach. Die eine Ratte wurde einen Tag vor dem errechneten Geburtstermin getötet und die Foeten aus dem Uterus entnommen. Die normal geborenen Jungen der

anderen Ratte wurden 6 Stunden bzw. 5 Tage nach der Geburt präpariert.

Serie III:

Einer trächtigen Rattenmutter wurde am 16. Trächtigkeitstag eine Dosis von 2,5 mCi (2,5 ml) [^3H] Thymidin transvaginal in die Uterushöhle appliziert und anschliessend mit 2,5 ml physiologischer NaCl-Lösung nachgespült. Die Instillation erfolgte mit einer Knopfkanüle durch Vagina und Cervix ins Corpus uteri. Die 14 Jungen dieses Wurfes wurden im Alter von 14 Tagen präpariert.

Alzet A

Einer trächtigen Ratte wurde am 15. Trächtigkeitstag eine Alzet Minipumpe mit 10 mCi (200 μl) [^3H] Thymidin subcutan am Hals implantiert. Dies erlaubte eine kontinuierliche Markierung während der letzten 7 Trächtigkeitstage. Die eine Hälfte des Wurfes wurde 18 Stunden nach der Geburt, die andere Hälfte im Alter von 7 Tagen präpariert.

Alzet B

Das Markierungsschema und die Gesamtdosis waren wie bei Alzet A. Die Jungtiere wurden 24 Std bzw. 10 Tage nach der Geburt präpariert.

Serie IV :

Eine Gesamtdosis von 50 mCi [^3H] Thymidin in 50 ml wurde lyophilisiert, mit Wasser auf ein Volumen von 200 μl gebracht und in eine Alzet Minipumpe abgefüllt. Diese Pumpe wurde 5 träch-

tigen Ratten hintereinander für je 1 Tag subcutan, dorsal am Hals implantiert. Der ersten Ratte wurde die Pumpe am 15. Trächtigkeitstag implantiert, nach 24 Stunden wieder entfernt und auf die nächste Ratte übertragen. So wurde erreicht, dass:

- die 1. Ratte vom 15. auf den 16. Trächtigkeitstag
- die 2. Ratte vom 16. auf den 17. Trächtigkeitstag
- die 3. Ratte vom 17. auf den 18. Trächtigkeitstag
- die 4. Ratte vom 18. auf den 19. Trächtigkeitstag
- die 5. Ratte vom 19. auf den 20. Trächtigkeitstag

markiert wurden. Die Pumpe wurde sodann auf eine 6. Ratte übertragen und vom 19. - 22. Trächtigkeitstag liegen gelassen. Bei den zwei sehr grossen Würfen der 2. Ratte (21 Junge) und der 4. Ratte (18 Junge), wurde je ein Drittel des Wurfs bereits nach 48 Stunden entnommen. Der Rest dieser Würfe und die Jungen der anderen Würfe wurden nach 15 Tagen präpariert.

Insgesamt wurden bei allen Versuchen genügende Aktivitäten in den isolierten Geweben erreicht. Die Versuchsserien mit den Alzet Minipumpen sollten insbesondere den Nachteil sehr hoher Spitzenkonzentrationen von [^3H] Thymidin eliminieren, wie sie bei intraperitonealer Injektion in den Muttertieren entstehen. Da bei der Markierung der Foeten das Muttertier einen sehr grossen Teil der Markiersubstanz in die eigenen Gewebe einbaut, musste bei diesen Versuchen die Dosis sehr hoch gewählt werden. Mit der Alzet Minipumpe konnte aber erreicht werden, dass die verwendete Markierlösung über die gesamte Implantationsdauer kontinuierlich ausgeschüttet und deshalb von den Foeten effizienter eingebaut wurde.

Eine Implantation von Alzet Minipumpen in die Jungtiere war nicht möglich, da die Pumpe im Verhältnis zu den neugeborenen Ratten zu gross war.

4.2.2. PRAEPARATION DES KORTEX

Bei der Präparation des Kortex wurde darauf geachtet, dass der Balken sowie alle Strukturen, welche nach der Geburt noch mitotische Zellgruppen enthalten können, also Hippocampus, Basalkerne, Bulbi olfactorii und die Wände der lateralen Hirnventrikel, sorgfältig entfernt wurden. So konnte vom 7. Tag an sichergestellt werden, dass nur Kortexgewebe in die Kernisolation miteinbezogen wurde. Von allen früheren Altersstufen wurden die ganzen Grosshirnhemisphären ohne Basalkerne und Riechhirn verwendet (Abb 7).

4.2.3. ISOLATION DER KORTEXNEURONENKERNE

Die Isolation von Kortexkernen wurde im wesentlichen nach der Methode von Kuenzle und Mitarbeitern (1977) ausgeführt. In Abänderung davon wurde bei allen Tieren, die jünger als 7 Tage alt waren, zur Waschung und Homogenisierung der Kortexperikaryen anstelle von 20 mM Tris-Maleat, pH 6,5 eine isotonische Lösung (0,32 M Saccharose, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM KH_2PO_4 , pH 6,5) verwendet. Für die abschliessende Isolation der Kerne aus dem Homogenat wurden jeweils 6 Gradienten angesetzt und die Kerne durch je 3 ml 2,2 M Saccharose, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM KH_2PO_4 , pH 6,5 zentrifugiert. Die der Kernisolation unmittelbar folgende Kontrolle im Phasenkontrast bei 400-facher Vergrösserung ergab stets einen Reinheitsgrad von mehr als 85%. Gelegentlich zu beobachtende Verunreinigungen stammten von Wandfragmenten aus Kapillaren.

Die Ausbeute an Kortexkernen pro Grosshirn betrug bei foetalem Grosshirngewebe zwischen 5 und 8 Mio Kerne. Die Kernaussbeute pro Tier verringerte sich mit zunehmendem Alter bis 7 d leicht (4,5 Mio Kerne) und bei älteren Tieren merklich bis unter 2 Mio Kerne (30 d).

4.2.4. ISOLATION DER LEBERKERNE

Die Präparation der Leberkerne wurde nach der Methode von Blobel und Potter ausgeführt (Blobel und Potter 1966). Die Ausbeute pro Gramm Lebergewebe war stets grösser als 40 Mio Kerne; sie war nicht altersabhängig. Der Reinheitsgrad betrug mehr als 90% bei allen Präparationen.

4.2.5. ISOLATION VON KLEINHIRN-KÖRNERZELLEN

Die Präparation von Kleinhirn-Körnerzellen erfolgte nach der Methode von Sellinger und Azcurra (1974). Die Körnerzellperikaryen sind so arm an Zytoplasma, dass eine Freisetzung der Kerne nicht nötig war. Die Ausbeute stieg mit zunehmendem Alter kontinuierlich von 1.75 Mio Kerne bei -4 d auf 8 Mio Kerne bei 42 d an.

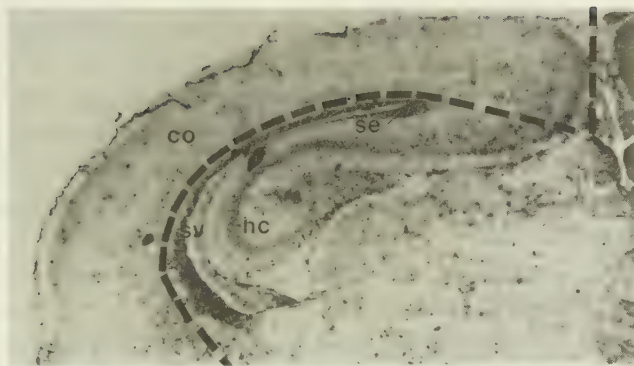


Abb 7

Querschnitt durch das Grosshirn einer Ratte im Alter von 14 Tagen. Die präparative Trennung des Kortextgewebes von den übrigen Hirnanteilen ist schematisch (-----) eingezeichnet. Diese Präparation erlaubte die Abtrennung aller mitotisch aktiven Hirnregionen.

co = Kortex, hc = Hippocampus, sv = Seitenventrikel, se = Subependymalschicht.

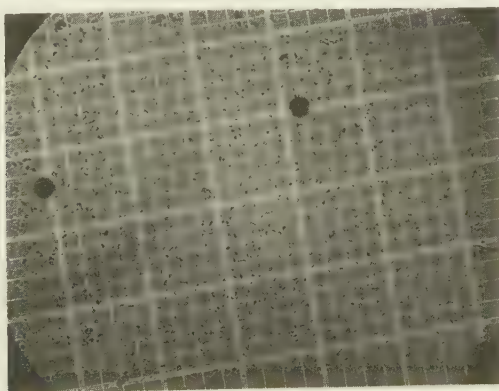


Abb 8

Anordnung zur Zählung von Neuronenkernen. Eine Kernsuspension bekannter Verdünnung wurde zur Zählung in eine Spencer-Zählkammer verbracht. In zwei unabhängigen Zählfeldern wurden je fünf Zählquadrate ausgezählt und die Werte gemittelt. Dargestellt ist ein Zählfeld mit 25 Zählquadraten. Es wurden stets die Eckquadrate und das Zentralquadrat ausgezählt.

4.2.6. ISOLATION VON GLIAZELLKERNEN

Die Isolation von Gliakernen wurde nach der Methode von Thompson (1973) ausgeführt. Die Kontrolle der isolierten Kerne im Phasenkontrast ergab eine Reinheit von mehr als 80%. Die Ausbeute pro Tier (30 Tage alt) betrug 1,6 Mio. Die Präparation des Kortex wurde wie in 4.2.2. beschrieben ausgeführt.

4.2.7. VERDAUUNG DER KERNE MIT MIKROKOKKEN - NUKLEASE

Die Kernsedimente (bei -70°C gelagert) wurden 5 min auf Eis gestellt und getaut. Anschliessend wurden die Kerne in einer Lösung aus 15 mM Tris-HCl pH 7,4 / 15 mM NaCl / 60 mM KCl / 15 mM β -Merkaptoäthanol / 0,5 mM Spermidin / 0,15 mM Spermin suspendiert und dreimal gewaschen. Die bei der letzten Waschung oft beobachtete Verklumpung der Kerne konnte durch mehrmaliges Aufziehen in eine Pasteur-Pipette und starkes Vibrieren auf dem Vortex-Schüttler gelöst werden. Nach der letzten Zentrifugation (5 min bei $200 \times g$) wurden die Kerne in 1 ml derselben Waschlösung suspendiert und mit dem Vortex-Schüttler sorgfältig aufgewirbelt.

Zur Kernzählung wurde dieser Suspension ein Aliquot von 5 μl entnommen, mit einer Verdünnungslösung, bestehend aus Waschlösung und 0,1% Nonidet, auf 100 μl eingestellt und in eine Spencer-Zählkammer verbracht. Das gewählte Verdünnungsverhältnis von 1 : 20 erlaubte eine einfache Berechnung der Kernzahl. Die Spencer-Zählkammer weist zwei unabhängige Zählfelder auf, von denen je fünf Zählquadrate ausgezählt wurden (Abb 8). Die Summe der Werte aus den 10 Zählquadraten wurde gemittelt und mit dem Faktor 10^6 multipliziert, was der Kernmenge pro ml Suspension entsprach. Die für die Zählung entnommene Probe wurde nachher verworfen.

Zur Verdauung mit Mikrokokken-Nuklease wurde der Kernsuspension ein Aliquot von 50 Mio Kerne entnommen und auf ein Volumen von 500 μ l mit Waschlösung verdünnt. Die Mikrokokken-Nuklease war in einer Stammlösung auf eine Konzentration von 7,5 U/ μ l eingestellt. Wie die Vorversuche ergaben, war die Verdauung bei 7,5 U/ 10 Mio Kerne optimal (siehe 5.1.). Für die Kernverdauung wurde die Suspension also mit 5 μ l Enzymlösung und 5 μ l 100 mM CaCl_2 versetzt und bei 37° C inkubiert. Die Verdauungszeiten ergaben sich aus den Vorversuchen (5.1.). Sie betrugen 300 s für die Leberkerne und 600 s für die Kerne von Kortexneuronen, Körnerzellen und Gliazellen. Der Verdauungsprozess wurde durch Zugabe von 15 μ l 100 mM EDTA pH 7,0 gestoppt. Gleichzeitig wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt.

4.2.8. DNS EXTRAKTION

Die durch die Nukleaseverdauung entstandenen Chromatinbruchstücke wurden zur Entproteinisierung nacheinander versetzt mit : 250 μ l einer 4% SDS-Lösung, 250 μ l 4M NaCl und 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (1 : 24, Vol/Vol). Die Emulsion wurde gut geschüttelt und zentrifugiert (5 min bei 2000 x g). Die wässrige Phase, welche nun die proteinfreien DNS-Bruchstücke in gelöster Form enthielt, wurde mit 2 Volumenteilen (= 2 ml) 95% Aethanol versetzt und über Nacht bei -20°C stehen gelassen. Die gefällte DNS wurde durch Zentrifugation (15 min bei 16000 x g) gewonnen und in 200 μ l Probenpuffer (10 mM Tris/ pH 7,4 1 mM EDTA) gelöst.

4.2.9. GEL-ELEKTROPHORESE

Das Prinzip der Gel-Elektrophorese beruht darauf, dass im Strukturgitter des polymerisierten Acrylamid / bis-Acrylamids ein Gemisch von Makromolekülen entsprechend ihrem

Molekulargewicht aufgetrennt werden kann. Die kleinsten Bestandteile des Gemisches wandern am weitesten, die grössten Bestandteile am wenigsten weit. Diese Migrationsdistanzen sind umgekehrt proportional den Logarithmen der Grösse der aufgetrennten Moleküle (Abb 9). Ueberträgt man die Migrationsdistanzen der Bandenmaxima eines aufgetrennten Gemisches auf logarithmisches Millimeterpapier und vergleicht sie mit den Migrationsdistanzen bekannter Vergleichssubstanzen, so kann man die Molekulargewichte der aufgetrennten Gemischkomponenten errechnen. In unseren Experimenten wurde als Referenz ein Gemisch von 11 DNS-Fragmenten definierter Molekulargewichte mitaufgetrennt, was die Erstellung einer Eichkurve ermöglichte. Die Markerfragmente wurden aus der DNS des Bakteriophagen ØX 174 durch Verdauung mit der Restriktionsendonuklease Hae III gewonnen. Die entstandenen Restriktionsfragmente sind von Sanger und Mitarbeitern sequenziert worden (Sanger et al 1978), so dass ihre Molekulargewichte genau bekannt sind. Wegen ihrer Einheitlichkeit ergeben sie auf dem Gel ein scharfes Bandenmuster (Abb 10). Deshalb sind sie für das Erstellen einer Eichkurve sehr geeignet.

Die durch Verdauung mit Mikrokokken-Nuklease entstandenen DNS-Fragmente wurden in Probenpuffer gelöst und ihre Konzentration im Spektrophotometer bei 260 nm gemessen (eine optische Dichte von 20 entspricht einer Lösung von 1 mg DNS / ml Lösung). Dazu wurde ein Aliquot von 3 µl 20-fach verdünnt und in einer Mikroküvette (Fassungsvermögen 60 µl) gegen Probenpuffer allein gemessen. Die Konzentration der gelösten DNS wurde mit Probenpuffer auf ca 0,4 µg DNS pro ml Lösung eingestellt. Für die Gel-Elektrophorese enthielt jede Probe 3 µg Chromatin-DNS und 5 ng Marker-DNS (Hae III verdaute DNS des Phagen ØX 174). Zusätzlich enthielten die Proben aus radioaktiv markierten Kernen 1 µl (0,012 ng DNS; 5,04 pCi) radioaktive Marker-DNS ([³H]

Thymidin markierte, Hae III verdaute ϕ X 174-DNS). Das Proben-
gemisch wurde mit Probenpuffer auf ein einheitliches Volumen
von 25 μ l gebracht und, um ein Absinken in die Geltasche zu
gewährleisten, mit 4 μ l einer 50%igen Saccharoselösung ver-
setzt. Letztere enthielt 4 μ g/ml Bromphenolblau als Farb-
indikator zur Kontrolle der Laufdistanz auf dem Gel.



Abb 9

DNS-Fragmente nach Verdauung mit Mikrokokken-Nuklease. Leberkerne einer 6h alten Ratte wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die entstandenen DNS-Fragmente auf Polyacrylamid-Agarose Gelen elektrophoretisch in absteigender Richtung getrennt. Die DNS-Fragmente wurden mit Ethidiumbromid selektiv angefärbt und im UV-Licht (254 nm) anhand ihrer Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die einzelnen Banden entsprechen von unten nach oben den monomeren, dimeren, trimeren und höher-oligomeren Chromatinbruchstücken.

Start

Front

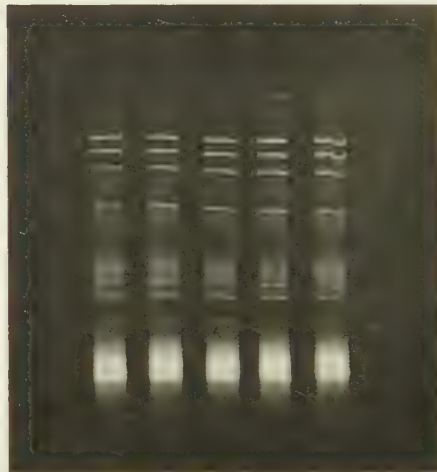


Abb 10

Analyse der Repetitionslänge von Leberchromatin. Leberkerne einer 24h alten Ratte wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die entstandenen DNS-Fragmente in Gegenwart von Marker-DNS elektrophoretisch getrennt. Uebrigste Bedingungen wie in Abb 9. Die scharfen Banden repräsentieren die Fragmente der Marker-DNS, die breiten Banden stellen die DNS-Fragmente des Leberchromatins dar.

Die elektrophoretische Trennung der DNS-Proben geschah in 2,5% Polyacrylamid - 0,5% Agarosegelen. Aus einer 40%igen Acrylamid und einer 2%igen bis-Acrylamidstammllösung wurden pro Gel je 3,75 ml in ein Becherglas pipettiert und mit 6,7 ml 12 mM Tris-Acetat, pH 7,8 / 60 mM Na-Acetat / 6 mM EDTA und 5,4 ml H₂O versetzt. Daneben wurde in einen kleinen Reaktionskolben 0,3 g Agarose eingewogen, mit 40 ml 40 mM Tris-Acetat, pH 7,8 / 20 mM Na-Acetat / 2 mM EDTA gelöst und im Wasserbad auf 70°C gehalten. Mit 2 Glasplatten und zwei Abstandstücken von 1,5 mm Dicke wurde die Gussform für das Gel vorbereitet und mit Kleband gussdicht verschlossen. Zur heissen Agaroselösung wurde sodann 0,025 ml TEMED pipettiert und zur Acrylamidlösung 0,52 ml 10% APS (frisch zubereitet) gegeben. Anschliessend wurde die heisse Agarose zur Acrylamidlösung gegeben, gut durchgemischt und sofort in die vorbereiteten Gussformen für die Gele geschüttet. Die Aussparungszähne für die Geltaschen wurden aufgesetzt. Darauf kamen die gefüllten Gussformen zum Polymerisieren der Gele für 2h in den Kühlschrank. Die 15 x 17 x 0,15 cm messenden Gele wurden an einen Vertikal-Gelapparat je paarweise befestigt. Als Elektrophoresepuffer wurde im Anoden- und im Kathodenbad eine Lösung von 40 mM Tris-Acetat, pH 7,8 / 20 mM NaAcetat / 2 mM EDTA verwendet. Während durchschnittlich 2 1/2 h wurde ein konstanter Strom von 50 mA bei einer Spannung von anfangs 90 V angesetzt. Der Lauf wurde abgebrochen wenn der Farbindikator der aufgetragenen Probe eine Distanz von 10,5 cm zurückgelegt hatte. Die Gele wurden anschliessend von der Glasplatte gelöst, in Ethidiumbromid (2 mg/ml in 1 mM EDTA, pH 7,5) während 7 min gefärbt und anschliessend während 10 min in 1 mM EDTA, pH 7,5 entfärbt. Diese Behandlung bewirkte einen optimalen Kontrast zwischen Gelhintergrund und angefärbten Banden. Unter der UV Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm wurde mit hochempfindlichem Polaroid Typ 57 Film ein bildfüllendes Photo hergestellt (Abb 10).

Zur Belichtung wurde ein doppeltes Rotfilter (Kodak FRP 651 und 426 vor die Kameralinse geschoben. Die Belichtungszeit lag zwischen 15 und 20 s. Von diesen Polaroid-Positivbildern wurden Mittelformatnegative 6x6 cm auf AGFAPAN 25 Professional-Film hergestellt.

Zum Nachweis radioaktiver DNS-Fragmente wurden die Gele nachfolgend während 1 Std in konzentrierter Essigsäure entwässert und anschliessend mit 20% PPO in konzentrierter Essigsäure während 1 h behandelt. Darauf wurden die Gele 1 Std gewässert und auf Whatman 3MM Elektrophoresepapier bei 60°C unter Vakuum getrocknet (Pulleyblank und Booth 1981). Die behandelten und getrockneten Gele wurden zur Fluorographie auf Kodak X-O mat Röntgenfilm 25 x 30 cm während 10-21 Tagen (je nach Intensität der Probenbanden) bei -70°C exponiert. Die Filme wurden vor der Exposition der Gele mit einem handelsüblichen Photoblitz (Braun, Typ E15, Leitzahl 15), welcher mit einem Orangefilter (Kodak Typ 21/22) abgeschirmt war, aus 1 m Distanz vorbeleuchtet. Für die Exposition der Gele wurde eine Verstärkerfolie (Ilford Screen) benützt. Die belichteten Röntgenfilme wurden in einem 3M Entwicklungsautomaten der Veterinär-medizinischen Klinik entwickelt.

4.2.10. AUSMESSEN DER REPETITIONSLAENGEN

Die Mittelformatnegative der Gelphotographien sowie die entsprechenden Fluorographien wurden mit einem Zweistrahl-Mikrodensitometer ausgewertet und die Kurven auf einfach logarithmisches Millimeterpapier aufgezeichnet. Für jede Kernpräparation wurden 2 bis 6 Gele zu je 5 bis 6 Bahnen angesetzt. Es wurden nur Bahnen mit einwandfreier Trennung der Proben ausgemessen, in jedem Fall aber mindestens 5. Zwei Beispiele von solchen Densitogrammen sind in Abb 11 und 12 dargestellt.

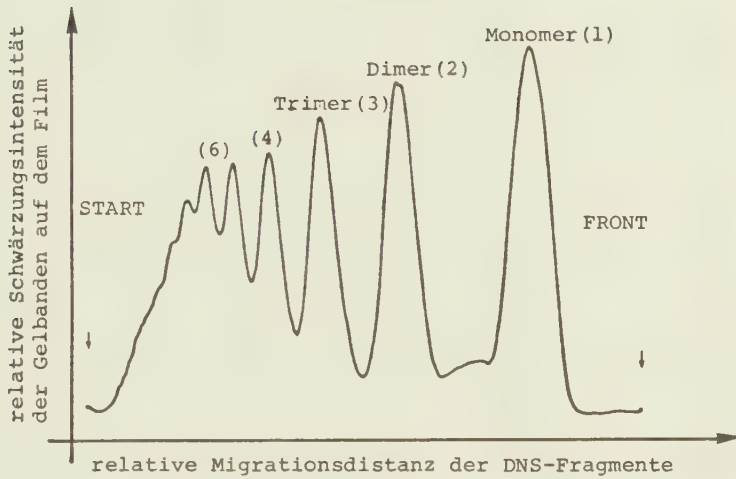


Abb 11

Densitogramm eines Gels analog demjenigen von Abb 9. Leberkerne einer 72 h alten Ratte wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut, die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Vom Originalphoto wurde eine Negativkopie hergestellt und mit einem Mikrodensitometer ausgewertet.

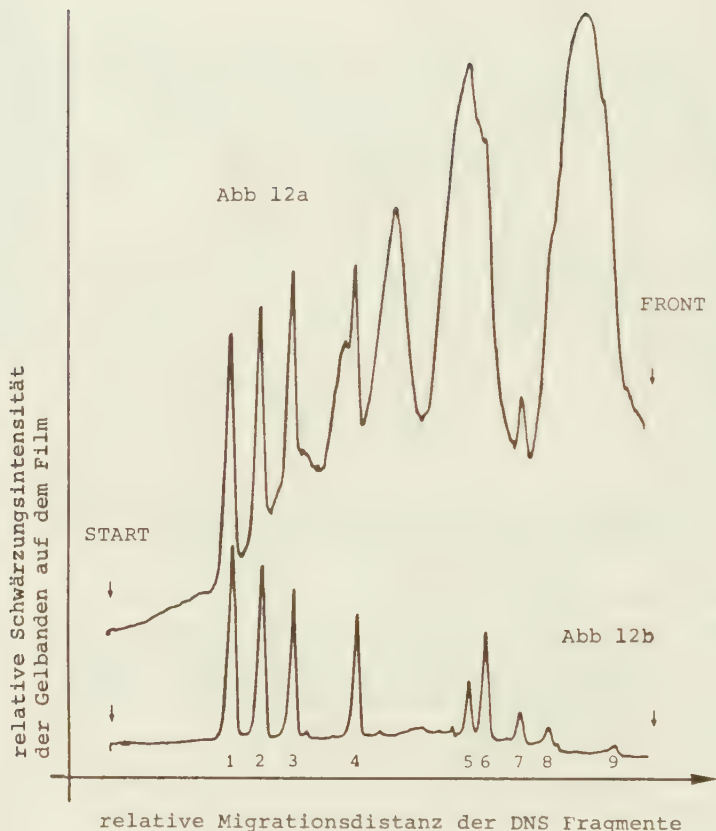


Abb 12

Densitogramme von Gelen zur Bestimmung der Repetitionslänge von Leberchromatin. (a) Leberkerne einer 72 h alten Ratte wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die entstandenen DNS-Fragmente in Gegenwart von Marker-DNS elektrophoretisch getrennt. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid ergab sich ein Bild analog demjenigen von Abb 10. Das Gel wurde photographiert und eine Negativkopie des Originalphotos angefertigt. Die Auswertung des Negativs erfolgte mit Hilfe eines Mikrodensitometers. Man erkennt die Ueberlagerung der DNS-Banden aus dem Chromatin mit denjenigen aus dem Marker.

(b) Elektrophorese der Marker-DNS-Fragmente allein (ϕ X 174 DNS mit Hae III verdaut). 9 Banden wurden zur Erstellung der Eichkurven verwendet. Sie entsprechen Fragmenten der folgenden Längen: Bande 1: 1353 BP, 2: 1078 BP, 3: 872 BP, 4: 603 BP, 5: 310 BP, 6a: 278 BP und 6b: 271 BP (überlagert), 7: 234 BP, 8: 194 BP, 9: 118 BP.

Da mit jeder Probe, das heisst in jeder einzelnen Bahn des Gels, Marker-DNS-Fragmente bekannter Grösse mitaufgetrennt wurden, konnte für jede einzelne Bahn eine individuelle Eichkurve erstellt werden. Anhand dieser Eichkurve konnten die Längen der DNS-Fragmente des verdauten Chromatins abgelesen werden. Die Repetitionslänge des Chromatins ergab sich aus den Grössenunterschieden zwischen Dimer und Trimer, Trimer und Tetramer usw., soweit die Auflösung der Banden dies zulies. Das Nukleosomen-Monomer wurde für die Berechnung nicht miteinbezogen, da es kein intaktes Zwischenstück enthält, sondern beidseits der Histonkugel nur Reste davon. Diese werden durch sekundären Angriff der Nuklease von beiden Seiten her fortlaufend verkürzt. Damit würde der Grössenunterschied zwischen dem Monomer und dem Dimer zu gross erscheinen und die daraus abgeleitete Repetitionslänge wäre zu lang. Die Grössenunterschiede zwischen den einzelnen, sich folgendenden oligomeren DNS-Bruchstücken waren innerhalb der Messgenauigkeit für jede Bahn identisch.

4.2.11. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Bei der Auswertung der mit Ethidiumbromid gefärbten Gele wurden die gemessenen Repetitionslängen aller Bahnen, Gele und aller Präparationen einer Altersstufe gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Bei der Auswertung der Fluorographien wurden die Repetitionslängen aller Bahnen und aller Gele einer einzelnen Präparation gemittelt. Dank der individuellen Eichkurve für jede Gel-Bahn konnte eine statistische Erfassung der methodisch bedingten Streuung entfallen.

5. RESULTATE UND DISKUSSION

5.1. VORVERSUCHE ZUR OPTIMIERUNG DES VERDAUUNGSVORGANGS

MIT MIKROKOKKEN-NUKLEASE

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Zellkernarten wurde ein Vorversuch angesetzt, bei welchem einerseits die Enzymmenge und andererseits die Verdauungszeit variiert wurde. Angestrebt wurde ein deutlich abgesetztes Bandenmuster bis zu den Penta- und Hexameren. Zu grosse Anteile an monomeren DNS-Stücken sowie unverdauten Chromatins sollten vermieden werden (Abb 13 bis 16). Alle Versuche wurden bei einer Reaktionstemperatur von 37°C durchgeführt. Mit einer Enzymmenge von 7,5 U / 10 Mio Kerne wurde bei allen Kernsorten ein gut interpretierbares Verdauungsmuster erhalten. Die optimale Inkubationszeit betrug 300 s für die Leberkerne und 600 s für die Kerne von Kortexneuronen, Körnerzellen und Gliazellen. Diese Bedingungen wurden in der Folge für alle Experimente dieser Arbeit verwendet.

Die Verdauungsversuche zeigten ausserdem, dass die ermittelte Repetitionslänge unabhängig war von Enzymmenge und Inkubationszeit (Tabelle 1). Allerdings nimmt mit zunehmender Enzymkonzentration und längerer Inkubationszeit der Anteil derjenigen DNS-Stücke immer mehr zu, die direkt mit dem Nukleosomenkernstück (Core) assoziiert sind, also frei sind von Verbindungsstück-DNS. Ihre Länge entsprach mit 146 BP dem Wert, der für alle bisher untersuchten Zelltypen gefunden wurde (Kornberg und Klug 1981).

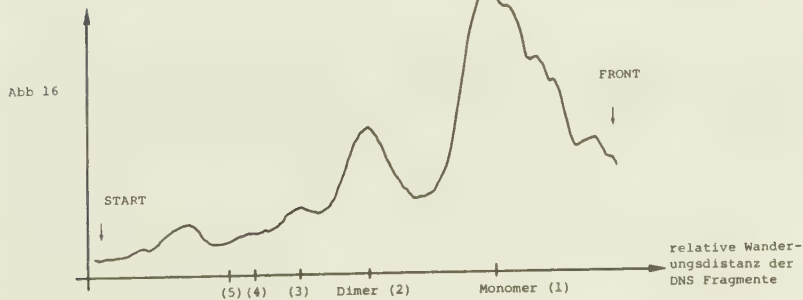
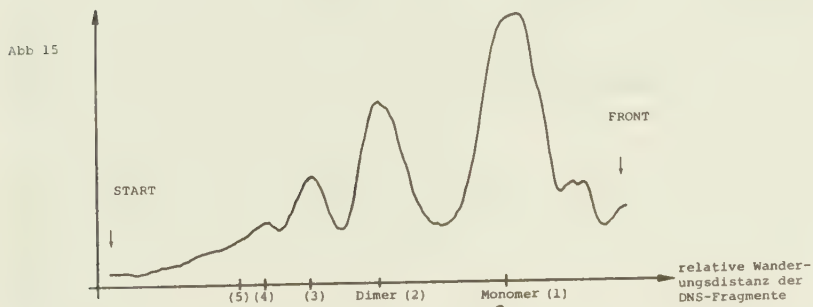
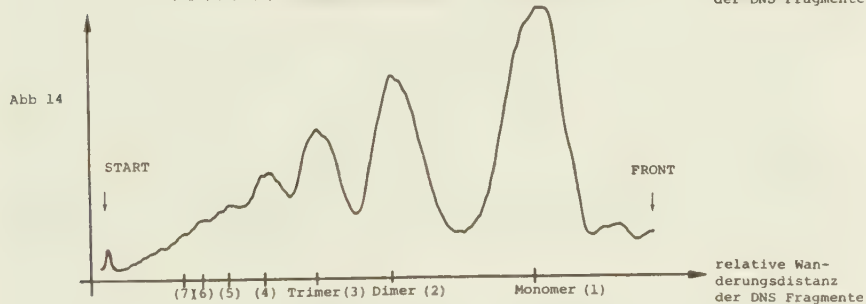
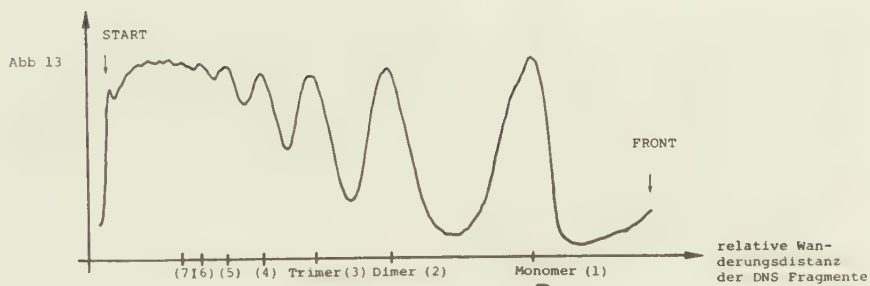


Abb 13 bis 16

Densitogramme von Gelen aus den Vorversuchen zur Festlegung der optimalen Reaktionsbedingungen. Kortexneuronenkerne (7 d) wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut. Variiert wurden die Enzymkonzentration und die Inkubationszeit. Die Reaktionstemperatur wurde mit 37°C konstant gehalten. Die Densitogramme wurden wie in der Legende zu Abb 12 beschrieben erstellt.

Abb 13 : 7,5 U/10 Mio Kerne, 300 s

Abb 14 : 7,5 U/10 Mio Kerne, 600 s

Abb 15 : 75 U/10 Mio Kerne, 300 s

Abb 16 : 75 U/10 Mio Kerne, 600 s

Tabelle 1

Abhängigkeit der gemessenen Repetitions-längen von Enzymmenge und Inkubationszeit. Verdaut wurden Kerne von Kortexneuronen aus 7 Tage alten Ratten.

Verdauungs- bedingungen	Abb.	Monomer/ Dimer	Dimer/ Trimer	Trimer/ Tetramer	Tetramer/ Pentamer
7,5 U/300 s	13	189 BP	172 BP	172 BP	171 BP
7,5 U/600 s	14	193	173	171	171
75 U/300 s	15	195	171	173	175
75 U/600 s	16	205	172	171	172

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, verändert sich die Repetitions-länge bei unterschiedlichen Verdauungsbedingungen nicht signifikant. Allerdings dürfen Längenunterschiede von DNS-Stücken der Nukleosomenmonomeren zu den Dimeren nicht miteinbezogen werden, da bei den Monomeren die Verbindungsstücke teilweise wegverdaut sind. Weitere Erklärungen siehe Text (h.p.10.).

5.2. REPETITIONSLÄNGEN IM CHROMATIN VON KORTEXNEURONEN

5.2.1. TOTALCHROMATIN

Der Entwicklungsverlauf der Chromatin-Repetitions-längen in Kortexneuronen wurde vom 18. Trächtigkeitstag (4 Tage vor der Geburt) bis zum 60. Lebenstag engmaschig verfolgt. Die DNS des Totalchromatins wurde durch Anfärben mit Ethidiumbromid dargestellt. Wie Abb 19 und Tabelle 2 zeigen, misst die Repetitions-länge in diesem Fall bis kurz vor der Geburt 200 BP, fällt dann in den ersten Tagen nach der Geburt rasch auf eine Länge von 173 BP (5 d) und dann langsam auf 171 BP (7 d) ab. In der Folge ändert sich die Repetitionslänge nur noch unwesentlich und erreicht am 14. Tag 170 BP. Dieser Wert wird bis ins adulte Stadium beibehalten.

Wie soll man sich die Aenderung der Chromatin-Repetitions-länge nun mechanistisch vorstellen? Das DNS-Stück, welches dem Nukleosomenkernstück assoziiert ist, misst in Kortexneuronen unabhängig vom Alter 140 bis 146 BP (Ermini und Kuenzle, 1978). Daraus kann geschlossen werden, dass die unterschiedlichen Repetitions-längen von einer Aenderung der Nukleosomenabstände herrühren. Offenbar rücken die Nukleosomen nach Abschluss der Chromatinsynthese näher zusammen (Abb 18). Im englischen Sprachgebiet verwendet man für diesen Vorgang den Ausdruck "Sliding".

Die Arbeitsgruppe von Kuenzle (Bregnard et al 1975, Bregnard et al 1977, Kuenzle et al 1978, Bregnard et al 1979, Studer et al 1981) hat gezeigt, dass bei der Ratte die Kortexneuronen nach der Geburt ihren DNS- und Histongehalt von 2 c (DNS-Gehalt einer diploiden Zelle) auf 3 c erhöhen. Dies ist in Abb 20 schematisch dargestellt. Vergleicht man diesen Entwicklungs-verlauf mit der in Abb 19 dargestellten Aenderung der

Repetitionslänge, so fällt eine exakte zeitliche Uebereinstimmung der beiden Phänomene während der Frühentwicklung auf. Dies deutet auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang hin, der aber zur Zeit noch nicht bewiesen ist.

Die zeitliche Koinzidenz der DNS-Zunahme und der Verkürzung der Repetitionslängen in Kortexneuronen wurde aber auch beim Meerschweinchen beobachtet. Dieser typische Nestflüchter hat eine längere Trächtigkeitsdauer als die Ratte, und die Jungen sind bei der Geburt viel weiter entwickelt. Die zelluläre Reifung des Meerschweinchengehirnes erfolgt noch während der Foetalperiode. In Bezug auf die Gehirnentwicklung entspricht der 35. Trächtigkeitstag beim Meerschweinchen dem Geburtstermin bei der Ratte. Studer und Mitarbeiter (1981) fanden, dass beim Meerschweinchen der DNS-Anstieg in Kortexneuronen zwischen dem 32. und 34. Trächtigkeitstag einsetzt, also sehr genau mit dem Differenzierungsprozess korreliert. Brown beobachtete ab demselben Zeitpunkt das Auftreten verkürzter Repetitionslängen (Brown, pers. Mitteilung 1981). Die zeitliche Koinzidenz zwischen DNS-Zunahme, Verkürzung der Repetitionslänge und zellulärer Differenzierung ist auch hier auffallend. Ein funktioneller Zusammenhang ist damit aber noch nicht bewiesen.

CHROMATINSTRUKTUR

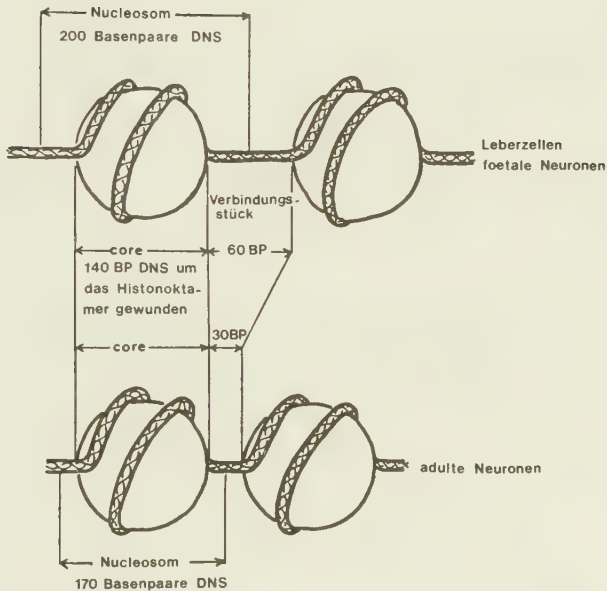


Abb 18

Modell eines Nukleosomen-Dimers mit einem intakten Verbindungsstück. Abb 18a zeigt die Nukleosomen in einem Abstand von 60 BP wie sie bei foetalen Neuronen bzw. bei Leberzellen aller Altersstufen gefunden wurde. Abb 18b zeigt die Nukleosomen mit einem kurzen Verbindungsstück von 30 BP wie sie im Chromatin von differenzierten Kortexneuronen gefunden wurden. Aus diesem Modell geht ebenfalls hervor, dass die Verkürzung der Repetitions-länge ausschliesslich durch Verkürzung des DNS-Verbindungsstücks zustande kommt.

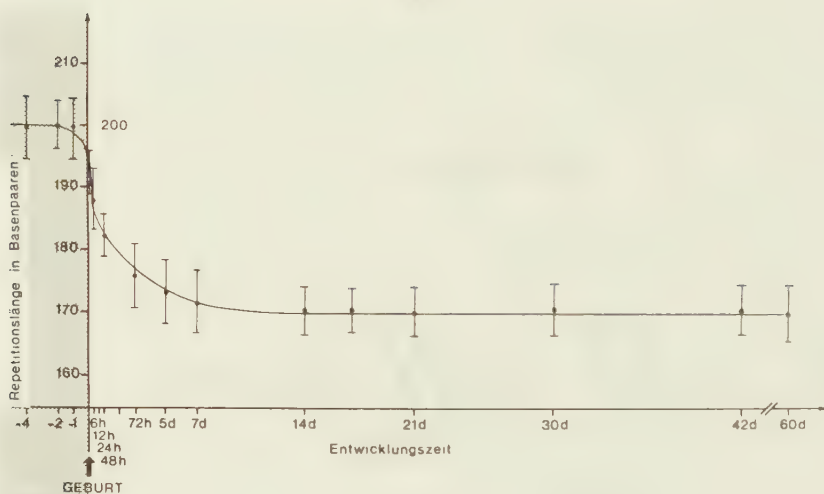


Abb 19: Entwicklungsverlauf der Chromatin-Repetitionslänge von Kortexneuronen. Kortexneuronenkerne der verschiedenen Altersstufen wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und mikrodensitometrisch ausgemessen. Messwerte, Code und Symbole siehe Tabelle 2.

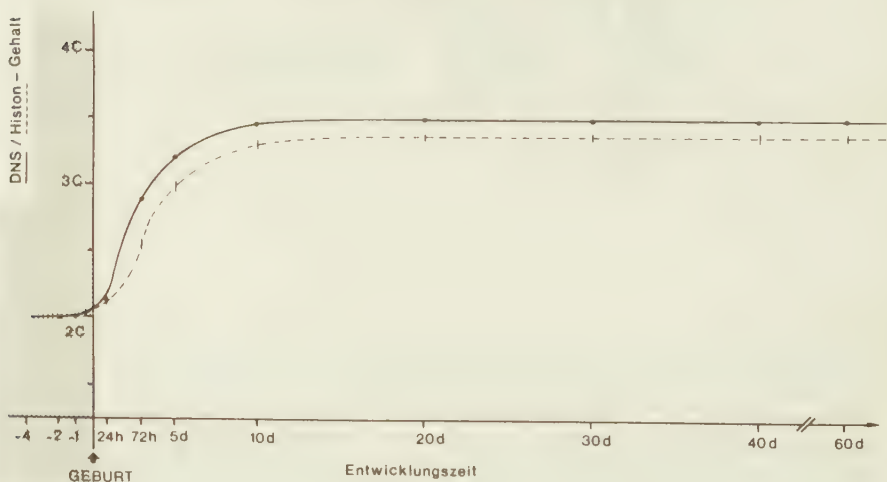


Abb 20: Verlauf der DNS-(Histon) Zunahme in Kortexneuronen der Ratte während der Frühentwicklung. Die ausgezogene Linie symbolisiert den Verlauf der DNS-, die unterbrochene Linie jenen der Histon-Zunahme in den ersten Lebenstagen.

5.2.2. POSTNATAL SYNTHETISIERTES CHROMATIN

Die Repetitions­längen wurden auch an Kortexneuronen gemessen, deren DNS nach der Geburt mit [^3H] Thymidin markiert worden war. Die Ausmessung erfolgte anhand von Fluorographien, so dass nur die Repetitions­längen des postnatal synthetisierten Chromatins erfasst wurden. Die Resultate sind in Abb 21 und Tabelle 3 zusammengefasst. Alle Altersstufen zeigen eine konstante Repetitions­länge von 200 BP. Dies steht im Widerspruch zu der Verkürzung, die bei Anfärbung des totalen Chromatins mit Ethidiumbromid beobachtet wurde (5.2.1.). Offenbar entspricht das bei der postnatalen Vermehrung der DNS gebildete Chromatin einer Subpopulation, deren Verpackung vom Durchschnitt aller Subpopulationen des Gesamtchromatins abweicht.

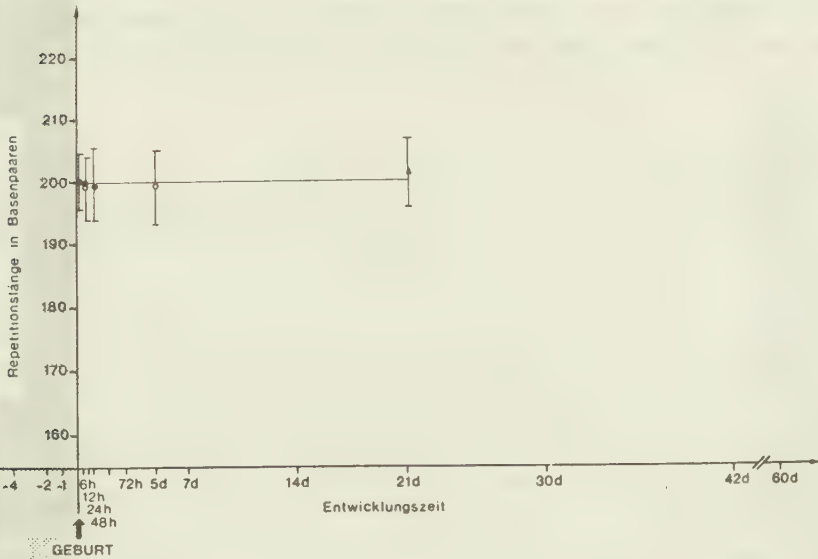


Abb 21 Entwicklungsverlauf der Chromatin-Repetitions­längen von Kortexneuronen. Die DNS wurde unmittelbar nach der Geburt durch Injektion von [^3H] Thymidin radioaktiv markiert. Kortexneuronenkerne der verschiedenen Altersstufen wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Von den Gelen wurden Fluorographien angefertigt und die Filme mikrodensitometrisch ausgewertet. Messwerte, Code und Symbole siehe Tab. 3.

5.2.3. PRAENATAL SYNTHETISIERTES CHROMATIN

Nachdem durch Anfärben mit Ethidiumbromid eine Verkürzung der Repetitionslänge des Gesamtchromatins nachweisbar war (5.2.1.), diese Verkürzung aber auf Fluorogrammen des postnatal synthetisierten Chromatins nicht in Erscheinung trat (5.2.2.), war es naheliegend, die Verkürzung in jenem Chromatinanteil zu suchen, welcher während der pränatalen Zellproliferation entsteht. Deswegen wurden trächtige Rattenweibchen zu verschiedenen Zeitpunkten der Gestation mit [^3H] Thymidin injiziert und die auf diese Weise pränatal markierten Kortexneuronenkerne der Jungen untersucht. Wiederum wurde für den Nachweis der DNS-Banden auf den Gelen die Fluorographie gewählt.

Bei zwei Würfen, die am 19. und 20. bzw. am 20. und 21. Trächtigkeitstag markiert worden waren, wurde bis zu 5 Tagen nach der Geburt keine Verkürzung der Chromatinrepetitionslänge gefunden (Abb 22 und Tabelle 4).

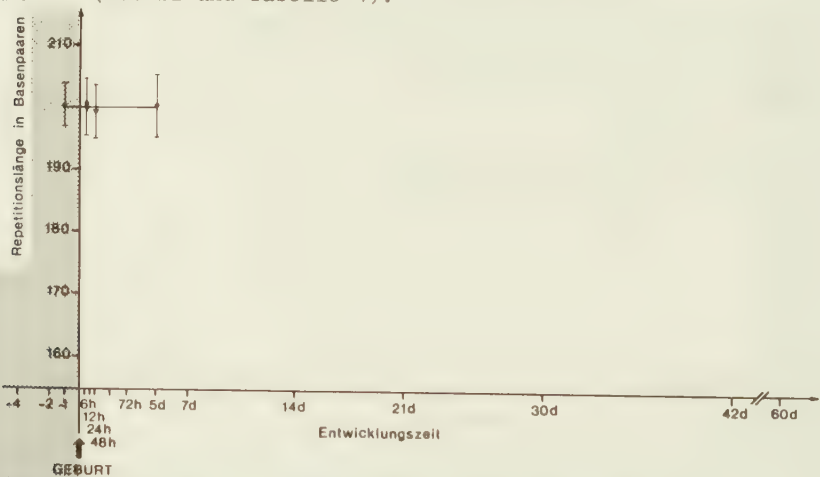


Abb 22 Entwicklungsverlauf der Chromatin-Repetitionslängen von Kortexneuronen. Die DNS wurde durch Injektion von [^3H] Thymidin in die Muttertiere am 19. und 20. (♦) bzw. 20. und 21. (♥) Trächtigkeitstag radioaktiv markiert. Die Kortexneuronenkerne wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Von den Gelen wurden Fluorographien angefertigt und die Filme mikrodensitometrisch ausgewertet. Messwerte, Code und Symbole siehe Tabelle 4.

Wurden die Foeten jedoch vom 15. - 22. Trächtigkeitstag kontinuierlich aus einer in das Muttertier implantierten ALZET-Pumpe markiert, so zeigte sich in den ersten 10 Tagen nach der Geburt eine Verkürzung der Chromatin-Repetitionslänge, wie sie auch durch Anfärben mit Ethidiumbromid beobachtet wurde (Abb 23 und Tabelle 5)

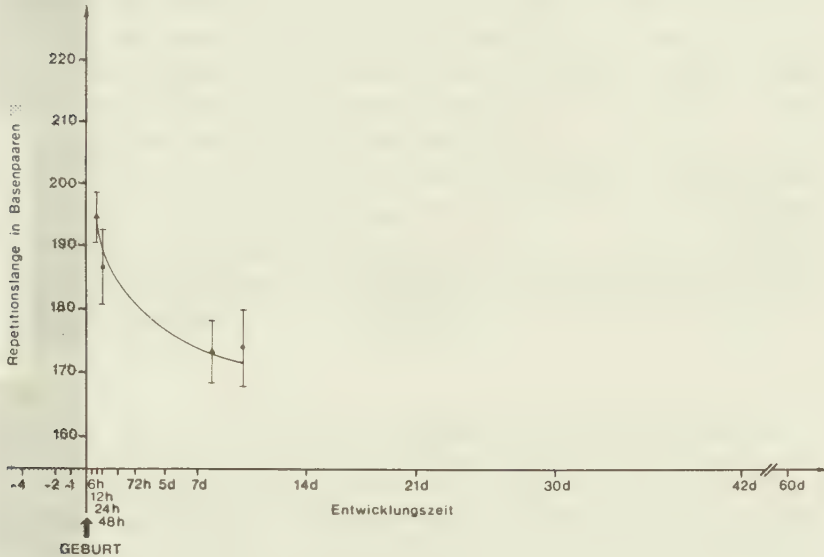


Abb 23

Entwickungsverlauf der Chromatin-Repetitionslängen von Kortexneuronen. Die DNS wurde durch Implantation einer mit [^3H] Thymidin gefüllten ALZET-Pumpe am 15. Trächtigkeitstag kontinuierlich bis zur Geburt radioaktiv markiert. Die Kortexneuronenkerne wurden in den Altersstufen 18 h, 24 h, 8 d und 10 d präpariert, mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Von den Gelen wurden Fluorographien angefertigt und die Filme mikrodensitometrisch ausgewertet. Messwerte, Code und Symbole siehe Tabelle 5.

Offenbar zeigen früh angelegte Neuronen eine Verkürzung der Repetitionslänge, spät angelegte jedoch nicht. Um diesen Sachverhalt genauer zu prüfen, wurden weitere Experimente durchgeführt. In insgesamt 5 trächtige Rattenweibchen wurde eine mit [^3H] Thymidin gefüllte ALZET-Pumpe je am 15., 16., 17., 18. und 19. Trächtigkeitstag implantiert und 24 h liegen gelassen. In einer sechsten Rattenmutter wurde eine ALZET-Pumpe vom 19. Trächtigkeitstag bis zur Geburt (22. Trächtigkeitstag) liegen gelassen. Eine kurzzeitige Markierung gelang in einer siebten Rattenmutter durch transvaginale Instillation von [^3H] Thymidin in die Uterushöhle am 16. Trächtigkeitstag. Die Ausmessung der Fluorographien ergab, dass das bis zum 18. Trächtigkeitstag markierte Chromatin nach der Geburt eine Verkürzung der Repetitionslängen erleidet (Abb 24 und Tabelle 6), während das später synthetisierte Chromatin den Ausgangswert von 200 BP auch nach der Geburt beibehält (Abb 22 und 24; Tabellen 4 und 6).

5.2.4. INTERPRETATION DER BEFUNDE

In der Einleitung (3.1.) wurde bereits festgehalten, dass die für die einzelnen Kortexschichten bestimmten Neurone zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung entstehen, d.h. ihren letzten Zellzyklus durchlaufen und dann differenzieren. Dabei entstehen die Neurone der Rindenschicht VI am 15. - 16. Trächtigkeitstag, diejenigen der Schicht V am 17., der Schicht IV am 18., und der Schichten II und III am 19. - 21. Trächtigkeitstag (Abb 2). Setzt man die in 5.2.3. beschriebenen Befunde über das Auftreten verkürzter Chromatin-Repetitionslängen in Beziehung zu diesem Zeitplan, so lässt sich vermuten, dass die Neurone der Rindenschichten IV, V und VI postnatal eine Verkürzung der Repetitionslänge auf 170 BP durchmachen, während die Schichten II und III die spätfoetale Repetitionslänge von 200 BP auch nach der Geburt beibehalten. Dieser Schluss muss allerdings durch histo-autoradiographische Studien noch belegt werden.

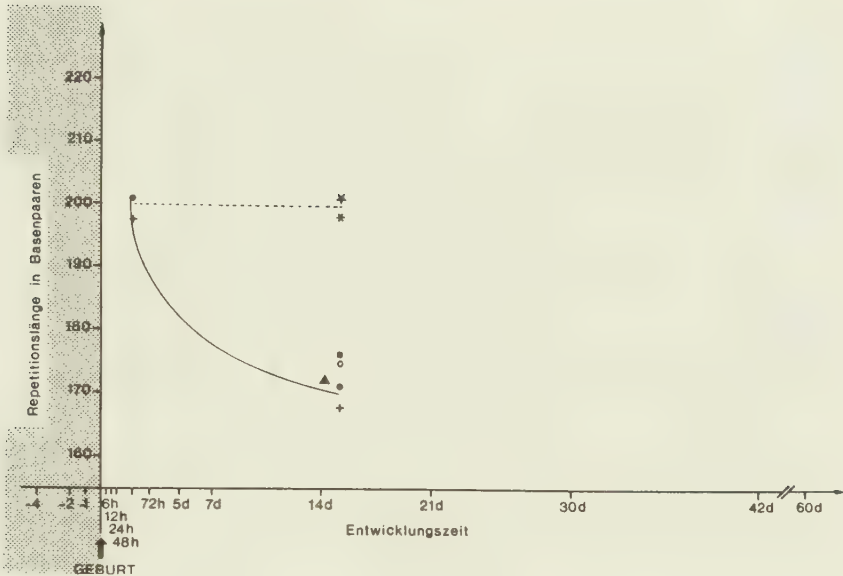


Abb 24

Entwicklungsverlauf der Chromatin-Repetitionsängen von Kortexneuronen. Die DNS wurde durch Implantation einer mit [^3H] Thymidin gefüllten ALZET-Pumpe ins Muttertier am 15. (○), 16. (+), 17. (■), 18. (●) und 19. (*) Trächtigkeitstag für je 24h kontinuierlich radioaktiv markiert. In einem weiteren Versuch wurde die Markierung vom 19. - 22. Trächtigkeitstag (▲) kontinuierlich mit einer ALZET-Pumpe vorgenommen. Ein Muttertier erhielt eine einmalige intrauterine Instillation von [^3H] Thymidin am 16. Trächtigkeitstag (▲). Die Kortexneuronenkerne wurden in den Altersstufen 48h bzw. 15d präpariert, mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Von den Gelen wurden Fluorographien angefertigt und die Filme mikrodensitometrisch ausgewertet. Messwerte, Code und Symbole siehe Tabelle 6.

Zytophotometrische Messungen haben ergeben, dass alle aus dem Kortex präparierten Neuronenkerne postnatal einen erhöhten DNS-Gehalt aufweisen (Bregnard et al 1975 , Bregnard und Kuenzle 1976, Kuenzle et al 1978, Bregnard et al 1979, Studer et al 1981). Diese Befunde wurden an Kernen erhoben, welche nach dem gleichen Verfahren isoliert worden waren wie es in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam. Andererseits wurde hier gezeigt, dass die Markierung von Zellkernen zu allen Zeiten der spätfoetalen Entwicklung möglich war, dass also offenbar die Kernpräparate Neurone aus allen Kortexschichten repräsentierten. Daraus muss geschlossen werden, dass auch die DNS-Vermehrung alle Kortexschichten erfasst. Es ist deshalb naheliegend zu vermuten, dass zum mindesten in den Rindenschichten IV, V und VI pränatal und postnatal synthetisierte DNS im Chromatin unterschiedlich verpackt sind, was sich in den Repetitionslängen von 170 BP bzw. 200 BP manifestiert.

5.3. REPETITIONSLAENGEN IM CHROMATIN VON KLEINHIRN-KOERNERZELLEN

Im Unterschied zu den Kortexneuronen zeigten die Körnerzellen im Verlauf der postnatalen Entwicklung nicht eine Verkürzung, sondern eine charakteristische Verlängerung der Chromatin-Repetitions-längen (Abb 25 und Tabelle 7). Während der Foetal-entwicklung und anschliessend bis zum 4. Postnaltag wurde eine extrem kurze Repetitions-länge von nur 165 BP gemessen. Etwa am 5. Lebenstag setzte eine Verlängerung der Nukleosomen-abstände ein, welche über den 30. Tag nach der Geburt an-dauerte. Die Repetitions-länge nahm in dieser Periode von 165 BP auf 218 BP zu. Der zeitliche Verlauf der Aenderung von Repetitions-längen in Chromatin von Körnerzellen korreliert also sehr genau mit dem Zeitplan der Enddifferenzierung dieser

Kleinhirneurone (Jacobson 1978).

Die Werte zwischen dem 7. und dem 22. Tag zeigten eine deutlich grössere Streuung als die Messwerte in den vorangehenden und nachfolgenden Entwicklungsstadien. Eine sichere Erklärung dafür kann nicht gegeben werden. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine Ueberlagerung kurzer und langer Repetitions-längen handelt. Die kurzen Repetitions-längen würden von undifferenzierten Zellen der äusseren Körnerschicht stammen, die bis zum 21. Tag mitotisch aktiv sind. Die langen Repetitions-längen würden von bereits ausdifferenzierten herrühren, die sich in der inneren Körnerschicht mit fortschreitender Entwicklung ansammeln. Das würde bedeuten, dass zwischen dem 7. und dem 22. Lebenstag, in dem Zeitraum also, wo die Verlängerung der Repetitions-länge stattfindet, jeweils ein statistisches Mittel der Ausgangs- und Endpopulationen beobachtet wird. Somit würde die Änderung der Repetitions-länge durch den beobachteten Kurvenverlauf nicht richtig wiedergegeben. Könnte der Verlauf in einzelnen Zellen gemessen werden, so ergäbe sich vermutlich eine wesentlich schnellere Chromatinumwandlung.

Die von den Fluorographien abgeleiteten Werte für die prä- und postnatal synthetisierte DNS (Abb 26 und 27, Tabellen 8 und 9) stimmten mit jenen der Ethidiumbromidfärbung (Totale DNS, Abb 25) überein. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Nachweismethoden konnten bei den Kleinhirn-Körnerzellen nicht festgestellt werden.

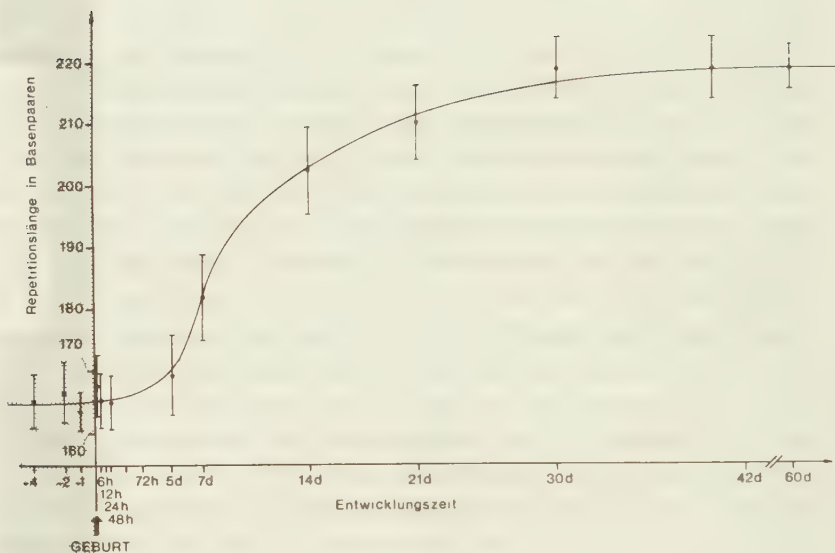


Abb 25

Entwicklungsverlauf der Chromatin-Repetitionslängen von Kleinhirn-Körnerzellen. Die Körnerzellkerne der verschiedenen Altersstufen wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und mikrodensitometrisch ausgemessen. Messwerte, Code und Symbole siehe Tabelle 7.

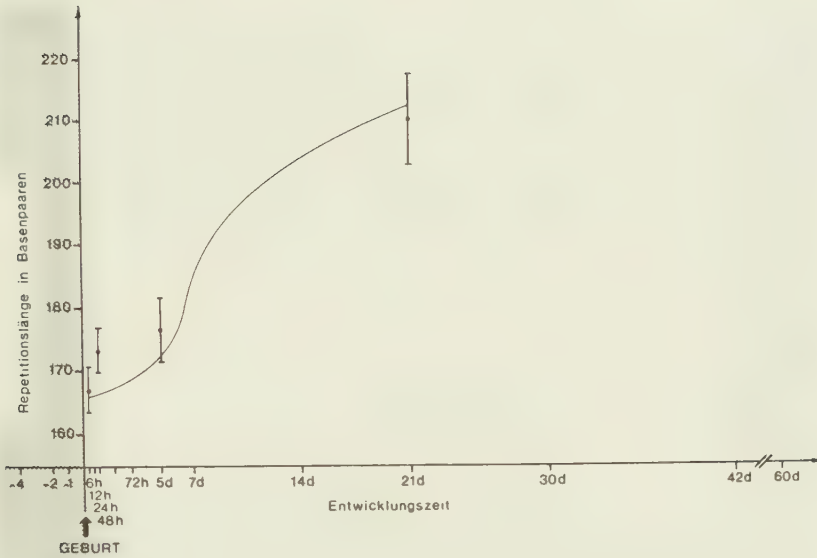


Abb 26

Entwicklungsverlauf der Chromatin-Repetitionslängen von Kleinhirn-Körnerzellen. Die DNS wurde durch Injektion von $[^3\text{H}]$ Thymidin unmittelbar nach der Geburt radioaktiv markiert. Die Körnerzellkerne der verschiedenen Altersstufen wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Von den Gelen wurden Fluorographien angefertigt und die Filme mikrodensitometrisch ausgewertet. Messwerte und Code siehe Tabelle 8.



Abb 27

Entwickungsverlauf der Chromatin-Repetitionslängen von Kleinhirn-Körnerzellen. Die DNS wurde durch Injektion von $[^3\text{H}]$ Thymidin in die Muttertiere am 19. und 20. bzw. 20. und 21. Trächtigkeitstag radioaktiv markiert. Die Körnerzellkerne wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Von den Gelen wurden Fluorographien angefertigt und die Filme mikrodensitometrisch ausgewertet. Messwert und Code siehe Tabelle 9.

5.4. REPETITIONSLÄNGEN IN CHROMATIN VON LEBERZELLEN

Die zu Vergleichszwecken mituntersuchten Leberzellen zeigten in ihrem Chromatin über den gesamten Zeitraum der Untersuchung, d.h. von -4 d bis 60 d, eine unveränderte Repetitionslänge von 200 BP. Die Ergebnisse aus den Fluorographien (prä- und postnatal markierte DNS, Abb 29 und 30, Tabellen 11 und 12) stimmten mit jenen aus der Ethidiumbromidfärbung (totale DNS, Abb 28 und Tabelle 10) überein.

Im untersuchten Zeitabschnitt gehen Aenderungen sowohl in der Proliferationsrate als auch in der morphologischen und biochemischen Differenzierung der Leber vor sich (Tsanev 1975). Daraus lässt sich folgern, dass Veränderungen der Chromatin-Repetitionslänge, wie sie bei Kortex- und Kleinhirnneuronen gefunden wurden, nicht in allen Organen eine obligate Begleiterscheinung von Entwicklungsprozessen sind (5.2. und 5.3.).

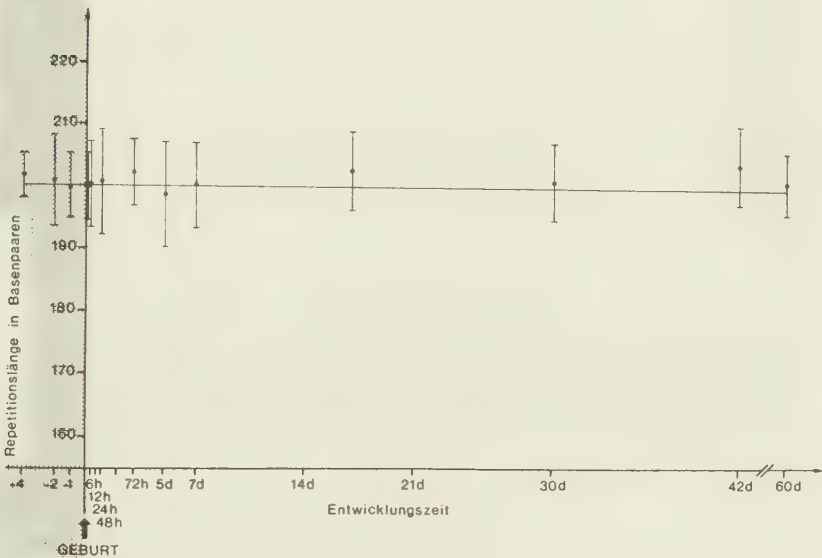


Abb 28

Entwicklungsverlauf der Chromatin-Repetitionslänge von Leberzellen. Leberzellkerne wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und mikrodensitometrisch ausgemessen. Messwerte und Code siehe Tabelle 10.

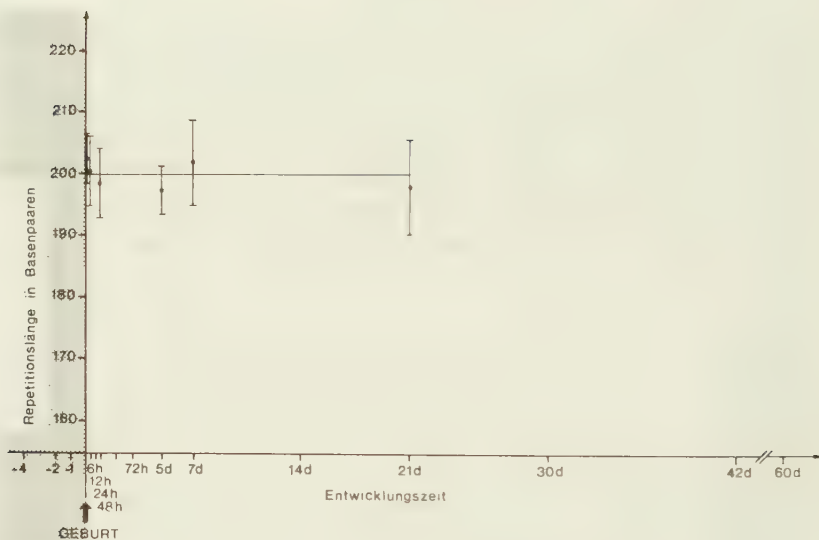


Abb. 29

Entwicklungsverlauf der Chromatin-Repetitionsängen von Leberzellen. Die DNS wurde durch Injektion von [^3H] Thymidin unmittelbar nach der Geburt radioaktiv markiert. Die Leberzellkerne wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Von den Gelen wurden Fluorographien angefertigt und die Filme mikrodensitometrisch ausgewertet. Messwerte und Code siehe Tabelle 11.

5.5. REPETITIONSLÄNGEN IM CHROMATIN VON NICHTASTROZYTAREN GLIAZELLEN AUS KORTEX

Bei diesem Zelltyp wurde kein Entwicklungsverlauf der Repetitionsängen untersucht, da die sichere Präparation von Vorstufen dieser Zellart nicht gelingt. Es wurden lediglich Ratten im Alter von 30 Tagen untersucht, zu einem Zeitpunkt also, in dem Kortex- und Kleinhirneurone ihr Chromatin bereits umgebaut haben (5.2., 5.3.). Die Messung der Repetitionsänge ergab bei Färbung mit Ethidiumbromid ein Mittel von 200 BP. Dieser Wert

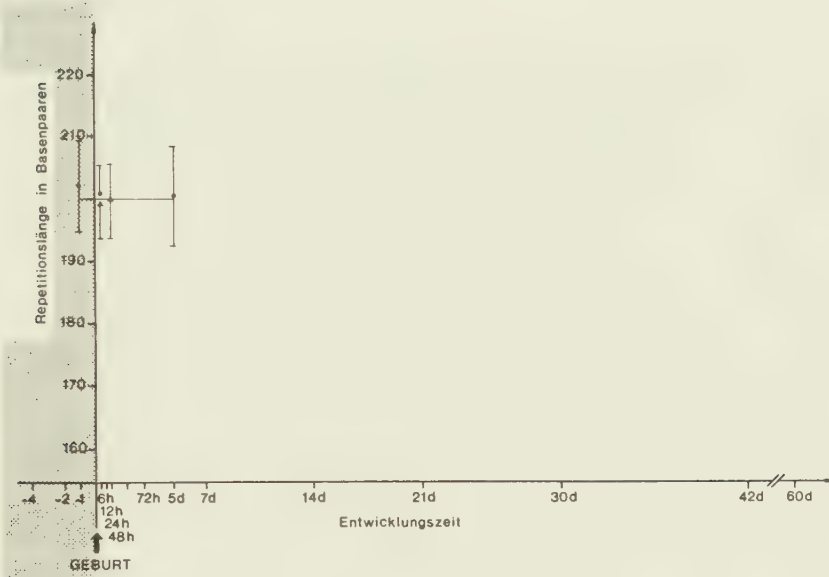


Abb 30

Entwickungsverlauf der Chromatin-Repetitions-längen von Leberzellen. Die DNS wurde durch Injektion von [^3H] Thymidin in die Muttertiere am 19. und 20. bzw. am 20. und 21. Trächtigkeitstag radioaktiv markiert. Die Leberzellkerne wurden mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt. Von den Gelen wurden Fluorographien angefertigt und die Filme mikrodensitometrisch ausgewertet. Messwerte und Code siehe Tabelle 12.

stimmt mit dem überein, welcher von Thomas und Thompson an vergleichbaren Zellen des Kaninchens gefunden wurde (Thomas und Thompson 1977). In diesem Experiment waren die Versuchstiere nicht radioaktiv markiert, was die Anfertigung von Fluorographien erübrigte.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Chromatin-Repetitionslänge von Kortexneuronen und Kleinhirn-Körnerzellen verändert sich während der Entwicklung unterschiedlich. Die Chromatin-Repetitionslängen bei der Ratte wurden bestimmt, indem die Zellkerne mit Mikrokokken-Nuklease verdaut und die DNS-Bruchstücke elektrophoretisch getrennt wurden. Die Repetitionslänge der Kortexneurone verkürzt sich von 200 BP bei Foeten auf 170 BP bei 14 Tage alten Tieren und verändert sich in der Folge bis ins adulte Stadium nicht mehr. Die Verabreichung von [^3H] Thymidin an trächtige Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten der Neurogenese ermöglichte es, die Neurone der verschiedenen Kortexschichten individuell zu markieren. Daraus ergab sich, dass nur die Kortexneurone der Schichten IV, V und VI die gefundene Verkürzung der Repetitionslänge erfahren. Demgegenüber verlängert die Körnerzellen des Kleinhirns die Chromatin-Repetitionslänge von ursprünglich 165 BP während der Foetal- und frühen Postnatalperiode (bis 5 Tage) auf 218 BP nach 30 Tagen. Auffällig ist, dass in beiden Hirnabschnitten, Kortex und Kleinhirn, die Veränderung der Repetitionslänge gleichzeitig mit den wichtigsten Reifungs- und Differenzierungsprozessen abläuft. Bei den in gleichen Altersstufen mituntersuchten Leberzellkernen wurde eine unveränderte Repetitionslänge von 200 BP gefunden. Nichtastrozytäre Gliazellen des adulten Kortex wiesen eine Repetitionslänge von 200 BP auf.

SUMMARY

The chromatin repeat lengths of cortex and cerebellar neurons change differentially during development in the rat

Chromatin repeat lengths were determined in the rat by micrococcal nuclease digestion followed by gel electrophoresis. The repeat length of cortex neurons decreased from 200 base pairs in fetuses to 170 base pairs at 14 days and all subsequent stages. Administration of [^3H] Thymidine to pregnant rats during the period of fetal neurogenesis allowed the neurons of individual cortex layers to be labeled differentially. This revealed that the shortening of the chromatin repeat length affected only neurons of layers IV to VI. In contrast, cerebellar neurons (granule cells) underwent lengthening of the repeat length from 165 base pairs at fetal and early postnatal stages (up to day 5) to 218 base pairs at 30 days. Thus, in both cortex and cerebellar neurons the changes occurred temporally coincident with major developmental processes. No changes were detected in liver nuclei during the same period. Non-astrocytic glia cells of the adult cortex had 200 base pair repeats.

REASSUNT

La lungezza repettenta da chromatin da neurons cortikels e da cellas granuledas cerebelleras as müdan diversamaing dürant il svilup fetel. Las lungezzas repettentas da chromatin da la ratta gnittan imsüredas in digerind ils nuschels cellulers cun nucleasa da micrococccs ed in separand electroforeticamaing ils fragmains da DNA. La lungezza repettenta dals neurons cortikels as scurznischa da 200 conjughels basels tal fet a 170 conjughels basels tal'individuum da 14 dis. A partir da quaist maint la lungezza nun as müda pü fin cha l'individuum ais creschieu. L'applicaziun da triciun-thymidin a rattas gravidas in divers stadiums da neurogeneses fetela pussibilitet da segner individuelmaing ils neurons dals divers strats cortikels. Il resultat füt, cha la lungezza repettenta as scurznischa be tals strats cortikels IV, V, VI. Cuntrariamaing as stenda la lungezza repettenta da las cellas granuledas cerebelleras da 165 conjughels basels dürant la fasa fetela fin al 5avel di da vita fin a 218 conjughels basels a l'eted da 30 dis. Ad ais remarchabel, cha la lungezza repettenta as müda al glistess temp culs pü importants svilups da differenziaziun e da madüraziun dals neurons cerebels e cerebellers. La lungezza repettenta da nuschels da cellas epaticas da 200 conjughels basels nun as müdan dürant las glissessas periodas da svilup. Cellas da glia na astrociteras dal cortex da rattas adultas haun üna lungezza repettenta da 200 conjughels basels.

7. TABELLEN

Tabelle 2

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 19
Repetitions-längen des Chromatins aus Kortexneuronen der Ratte
während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die totale
DNS. Diese ergaben sich durch Anfärben der Gele mit Ethidium-
bromid und Sichtbarmachung im UV-Licht.

Alter / Code .	Mittelwert (BP)	Streuung ($\pm$ BP)	Anzahl Messungen
H -4d	199,7	5,4	16
H -2d	200,2	4,5	24
H -1	199,5	5,1	31
H 2h	192,6	4,5	19
H 6h	188,2	4,9	28
H 24h	182,1	3,7	23
H 72h	175,8	4,9	17
H 5d	173,0	5,0	19
C 7d	171,5	5,0	17
C 14d	170,2	4,0	21
C 17d	170,3	3,3	19
C 21d	169,8	4,2	26
C 30d	170,3	4,1	24
C 42d	169,7	3,7	22
C 60d	169,4	4,4	18

Tabelle 3

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 21

Repetitions-längen des Chromatins aus Kortexneuronen der Ratte während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die mit [³H] Thymidin postnatal markierte DNS. Diese ergaben sich aus Fluorographien der Gele. Der interne Code bezeichnet Gewebe, Alter und Markierungszeit der Versuchstiere und ist in 4.2.1 detailliert ausgeführt.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung (± BP)	Anzahl Messungen	Symbol
H 2h (Thy neug)	200,2	4,4	15	■
H 6h (Thy 0)	199,5	4,7	11	●
H 6h (Thy post)	199,5	5,2	8	○
H 24h 0)	199,5	6,4	20	●
H 5d (Thy post)	199,2	5,9	14	○
C 7d (Thy 0)	200,3	3,5	12	●
C 21d (Wurf H)	201,2	5,7	17	▲

Tabelle 4

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 22

Repetitions-längen des Chromatins aus Kortexneuronen der Ratte während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die an zwei aufeinanderfolgenden Trächtigkeitstagen durch i.p. Injektion von [³H] Thymidin pränatal markierte DNS. Diese ergaben sich aus den Fluorographien der Gele. Der interne Code bezeichnet Gewebe, Alter und Markierungszeit der Versuchstiere und ist in 4.2.1 detailliert ausgeführt.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung (± BP)	Anzahl Messungen	Symbol
H-1 (Thy-2/-3)	200,3	3,2	9	●
H 6h (Thy-2/3)	200,5	4,5	8	●
H 6h (Thy-1/-2)	200,0	4,7	16	▼
H 24h (Thy-1/-2)	199,6	4,2	18	▼
H 5d (Thy-2/-3)	200,2	4,9	10	●

Tabelle 5

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 23
Repetitions-längen des Chromatins von Kortexneuronen der Ratte während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die vom 15. - 22. Trächtigkeitstag durch Implantation einer ALZET-Pumpe kontinuierlich mit [³H] Thymidin pränatal markierte DNS. Diese ergaben sich aus den Fluorographien der Gele. Der interne Code bezeichnet Gewebe, Alter und Markierungsform der Versuchstiere und ist in 4.2.1. detailliert aufgeführt.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung ($\pm$ BP)	Anzahl Messungen	Symbol
Alzet A 18h	194,6	3,8	12	▲
Alzet B 24h	186,59	6,0	14	●
Alzet A 8d	172,8	4,9	11	▲
Alzet B 10d	173,6	6,8	10	●

Tabelle 6

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 24
Repetitions-längen des Chromatins aus Kortexneuronen der Ratte während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die an einzelnen Trächtigkeitstagen mit [³H] Thymidin pränatal markierte DNS. Diese ergaben sich aus den Fluorographien der Gele. Der interne Code bezeichnet Gewebe, Alter und Markierungszeit der Versuchstiere und ist in 4.2.1. detailliert aufgeführt.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung ($\pm$ BP)	Anzahl Messungen	Symbol
C 15d IV 15/16	175,2	4,0	10	⊙
H 48h IV 16/17	198,5	5,8	9	+
C 15d IV 16/17	166,8	7,0	11	+
C 15d IV 17/18	175,7	5,5	10	■
H 48h IV 18/19	200,8	4,3	14	●
C 15d IV 18/19	171,2	6,9	9	●
C 15d IV 19/20	201,1	6,0	10	*
C 15d IV 19/22	198,7	4,6	11	★
C 14d 3.106.	171,8	5,1	8	▲

Tabelle 7

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 25
Repetitions-längen des Chromatins aus Kleinhirn-Körnerzellen
der Ratte während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte
für die totale DNS. Diese ergaben sich durch Anfärben der Gele
mit Ethidiumbromid und Sichtbarmachung im UV-Licht.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung ($\pm$ BP)	Anzahl Messungen
K -4d	164,9	4,6	12
K -2d	166,5	5,2	12
K -1d	163,2	3,1	14
K 2h	166,3	4,8	16
K 6h	165,3	4,4	9
K 24h	164,8	4,7	13
K 5d	169,1	7,1	15
K 7d	181,8	6,8	18
K 14d	202,4	6,9	16
K 21d	210,0	6,0	12
K 30d	214,6	4,8	15
K 42d	218,7	5,2	10
K 60d	217,9	3,1	8

Tabelle 8

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 26
Repetitions-längen des Chromatins aus Körnerzellen der Ratte während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die mit [³H] Thymidin postnatal markierte DNS. Diese ergaben sich aus Fluorographien der Gele. Der interne Code bezeichnet Gewebe, Alter und Markierungszeit der Versuchstiere und ist in 4.2.1. detailliert aufgeführt.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung (+ BP)	Anzahl Messungen
K 6h (Thy 0)	166,4	3,9	9
K 24h (Thy 0)	168,2	3,7	10
K 5d (Thy post)	171,2	5,0	10
K 21d (Wurf H)	209,7	7,1	9

Tabelle 9

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 27
Repetitions-längen des Chromatins aus Körnerzellen der Ratte während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die an zwei aufeinanderfolgenden Trächtigkeitstagen durch i.p. Injektion von [³H] Thymidin pränatal markierte DNS. Diese ergaben sich aus den Fluorographien der Gele. Der interne Code bezeichnet Gewebe, Alter und Markierungszeit der Versuchstiere und ist in 4.2.1. detailliert aufgeführt.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung (+ BP)	Anzahl Messungen
K -1d (-2/-3)	166,4	3,7	8
K 6h (-1/-2)	165,8	4,4	6
K 24h (-1/-2)	166,9	7,0	10
K 5d (-2/-3)	167,4	3,9	7

Tabelle 10

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 28
 Repetitions-längen des Chromatins aus Leberzellen der Ratte
 während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die
total DNS. Diese ergaben sich durch Anfärben der Gele mit
Ethidiumbromid und Sichtbarmachung im UV-Licht.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung ($\pm$ BP)	Anzahl Messungen
L -4d	201,7	3,8	20
L -2d	200,8	7,5	19
L -1d	199,9	5,3	24
L 2h	199,7	5,2	23
L 6h	200,3	6,9	18
L 24h	200,6	8,4	19
L 72h	202,15	5,3	25
L 5d	198,4	8,3	20
L 7d	199,5	6,8	20
L 17d	202,3	6,4	21
L 30d	200,6	6,2	22
L 42d	203,0	6,4	20
L 60d	199,6	4,9	18

Tabelle 11

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 29
Repetitionslängen des Chromatins aus Leberzellen der Ratte während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die mit [³H] Thymidin postnatal markierte DNS. Diese ergaben sich aus Fluorographien der Gele. Der interne Code bezeichnet Gewebe, Alter und Markierungszeit der Versuchstiere und ist in 4.2.1. detailliert aufgeführt.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung ($\pm$ BP)	Anzahl Messungen
L 2h (Thy neug)	202,4	4,1	12
L 6h (Thy 0)	200,5	5,7	10
L 24h (Thy 0)	198,4	5,5	9
L 5d (Thy post)	197,3	3,9	11
L 7d (Thy 0)	201,7	7,0	8
L 21d (Wurf H)	197,6	7,1	10

Tabelle 12

Zusammenfassung der Messwerte zu Abb 30
Repetitionslängen des Chromatins aus Leberzellen der Ratte während der Entwicklung. Angegeben sind die Werte für die an zwei aufeinanderfolgenden Trächtigkeitstagen durch i.p. Injektion von [³H] Thymidin pränatal markierte DNS. Diese ergaben sich aus den Fluorographien der Gele. Der interne Code bezeichnet Gewebe, Alter und Markierungszeit der Versuchstiere und ist in 4.2.1. detailliert aufgeführt.

Alter / Code	Mittelwert (BP)	Streuung ($\pm$ BP)	Anzahl Messungen
L -1d (-2/-3)	202,1	8,0	9
L 6h (-2/-3)	199,4	6,7	7
L 6h (-1/-2)	200,8	6,1	10
L 24h (-1/-2)	199,7	6,1	10
L 5d (-2/-3)	200,1	8,8	12

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Bregnard, A., Knüsel, A., and Kuenzle, C.C. (1975)
Are all the neuronal nuclei polyploid?
Histochemistry 43, 59-61
- Bregnard, A., Kuenzle, C.C., and Ruch, F. (1977)
Cytophotometric and autoradiographic evidence for postnatal
DNA synthesis in neurons of the rat cerebral cortex
Experimental Cell Research 107, 151-157
- Bregnard, A., Ruch, F., Lutz, H., and Kuenzle, C.C. (1979)
Histones and DNA increase synchronously in neurons during
early postnatal development of the rat forebrain cortex
Histochemistry 61, 271-279
- Brown, I.R. (1978)
Postnatal appearance of a short DNA repeat-length in neurons
of the cerebral cortex
Biochemical and Biophysical Research Communications 84, 285-292
- Ermini, M., and Kuenzle, C.C. (1978)
The chromatin repeat length of cortical neurons shortens
during early postnatal development
FEBS-Letters 90, 167-172
- Felsenfeld, G. (1978)
Chromatin
Nature 271, 115-122
- Fujita, S. (1967)
Quantitative analysis of cell proliferation and differentiation
in the cortex of the postnatal mouse cerebellum
Journal of Cell Biology 32, 277-287
- Jacobson, M. (1978)
Developmental neurobiology (second edition)
Holt, Rinehart and Winston Inc., N.Y.

Klug, A., Rhodes, D., Smith, J., Finch, J.T., and Thomas, J.O. (1980)

A low resolution structure for the histone core of the nucleosome

Nature 278, 509-516

Kornberg, R.D., and Klug, A. (1981)

The nucleosome

Scientific American 244, No 2, 48-60

Kuenzle, C.C., Bregnard, A., Hübscher, U., and Ruch, F. (1978)

Extra DNA in forebrain cortical neurons

Experimental Cell Research 113, 151-160

Kuenzle, C.C., Knüsel, A., and Schümperli, D. (1977)

Isolation of neuronal nuclei from rat brain cortex, rat cerebellum and pigeon forebrain

Methods in Cell Biology 15, 89-96

Martin, R. (1962)

Entwicklungszeiten des Zentralnervensystems von Nagern mit Nesthocker- und Nestflüchterontogenese

Revue Suisse de Zoologie 69, 617-727

Noll, M. (1974)

Subunit structure of chromatin

Nature 251, 249-252

Noll, M. (1974)

Internal structure of the chromatin subunit

Nucleic Acids Research 1, 1573-1578

Pulleyblank, D.E., and Booth, G.M. (1981)

Improved methods for the fluorographic detection of weak β -emitting radioisotopes in agarose and acrylamide gel-electrophoresis media.

Journal of Biomedical and Biophysical Methods 4, 339-346

- Rakic, P. (1981)
Neuronal-glial interaction during brain development
Trends in Neurosciences 4, 184-187
- Sanger, F., Coulson, A.R., Friedmann, T., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, W.L., and Fiddes, J.C. (1978)
The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X 174
Journal of Molecular Biology 125, 225 - 246
- Sellinger, O.Z., Azcurra, J.M., Johnson, D.E., Ohlsson, W.G., and Lodin, Z. (1971)
Independence of protein synthesis and drug uptake in nerve cell bodies and glial cells isolated by a new technique
Nature New Biology 230, 253-256
- Studer, M., Hobi, R., Ruch, F., and Kuenzle, C.C. (1981)
The DNA content of cortex neurons increases concomitant with terminal differentiation
in Vorbereitung
- Thomas, J.O., and Thompson, R.J. (1977)
Variation in chromatin structure in two cell-types from the same tissue: Short DNA repeat length in cerebral cortex neurons
Cell 10, 633-640
- Thompson, R.J. (1977)
Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex
Journal of Neurochemistry 21, 19-40
- Tsanev, R. (1975)
Cell cycle and liver-function
Cell Cycle and Differentiation (Results and Problems in Cell Differentiation)
Springer Verlag Berlin
- Whatley, A.S., Hall, C., and Lim, L. (1981)
Chromatin organisation in the rat hypothalamus during early development
Biochemical Journal 196, 115-119

9. DANKESADRESSEN

Folgenden Damen und Herren möchte ich für ihre Mitarbeit herzlich danken:

- Herrn Prof. Dr. Dr. Clive C. Kuenzle für die Ueberwachung der Experimente, die Korrektur des Manuskripts sowie für das Referat.
- Herrn Prof. Dr. E. Jenny für die Durchsicht des Manuskripts und für das Korreferat.
- Herrn Prof. Dr. F. Ruch für die Benützung des Densitometers.
- Herrn Dr. U. Hübscher für die Durchsicht des Manuskripts.
- Herrn W. Römer, Frau M.L. Moret, Frau R. Heidelberger, Frau E. Arnold für die wertvolle, technische Mitarbeit und die moralische Unterstützung.
- Frl. M. Stalder für die Niederschrift des Manuskripts
- Frau S. Pletscher und Frau A. Hug für die graphische Gestaltung.
- Herrn A. Portmann und Herrn H.R. Beer des ACI der Universität für die Mitbenützung des Spektrophotometers sowie des Microdensitometers.
- Herr E. Laraida am Zoologischen Institut der Universität Zürich für die Einführung und Mitbenützung des Kleincomputers CROMENCO CM 2.
- Herrn N. Janowsky für die Beschaffung und Pflege der Versuchstiere sowie für die Mithilfe bei der Präparation
- Herrn M. Studer für die Herstellung von Autoradiographien von Hirnschnitten und für die Mithilfe bei Präparationen.
- Diese Arbeit wurde unterstützt durch den Schweiz. Nationalfonds, Kredit Nr. 3.604 - 0.80

10. LEBENSLAUF

Jaeger Adrian Walter, geboren am 26. Mai 1952 in Winterthur,
Bürger von Pfäfers SG, ledig.

1959 - 1965	Primarschule in Winterthur
1965 - 1967	Sekundarschule in Winterthur
1967 - 1968	Kantonsschule in Samedan GR
1968 - 1972	Kantonsschule in Winterthur
Sept 1972	Maturität Typ C in Winterthur
1972 - 1973	Jurastudium an der Universität Bern
1973 - 1974	Studium der Naturwissenschaften (Biochemie) an der Abt X der ETH Zürich
1974 - 1980	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich, inklusive eines unfallbedingten Urlaubsemesters, mit Praktikum auf Grosstierpraxis in Sils-Maria von Mai - Okt. 1976
Sept. 1980	Staatsexamen der Veterinärmedizin an der Veterinär-medizinischen Fakultät der Universität Zürich.
15. Okt. 1980 - 31. Okt. 1981	Assistent am Institut für Pharmakolo- gie und Biochemie der Veterinär- medizinischen Fakultät der Universität Zürich.
Seit 1. Nov. 1981	Assistent am Institut für Veterinär- Physiologie der Veterinär-Medizini- schen Fakultät der Universität Zürich

